

Aus der Klinik für Allgemein-, Viszeral-, Gefäß- und Transplantationschirurgie  
am Klinikum der Ludwig-Maximilians-Universität München, Campus Großhadern

Direktor: Prof. Dr. med. J. Werner

# Mechanismen der kompromittierten Interaktion von T-Zellen und antigenpräsentierenden Zellen bei abdominalchirurgischen und septischen Patienten.



Dissertation  
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von  
Niclas Jasper Prix  
aus  
München  
2016

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. med. Martin K. Angele
Mitberichterstatter:	Priv. Doz. Dr. med. Jan Groetzner Priv. Doz. Dr. med. Michael S. Kasperek
Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter:	Dr. med. Markus Albertsmeier
Dekan:	Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel
Tag der mündlichen Prüfung:	17.03.2016

Auszüge der Arbeit wurden bei folgenden Kongressen vorgestellt:

Posterpräsentation auf dem 35th Annual Meeting of the Shock Society

9. – 13. Juni 2012, Miami Beach, Florida, USA

Albertsmeier M, **Prix NJ**, Winter H, Faist E, Angele MK.

Monocytes Differentially Modulate T-Cell Function Following Surgical Trauma or Sepsis.

Posterpräsentation auf dem 130. Kongresses der Deutschen Gesellschaft für Chirurgie

30. April 2013 - 03. Mai 2013, München

Albertsmeier M, **Prix N**, Pratschke S, Kleespies A, Winter H, Bruns CJ, Angele MK.

Monocyte-Dependent Suppression of T-Cell Function Following Surgical Trauma in Humans.

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>7</b>
<b>1 EINLEITUNG.....</b>	<b>9</b>
1.1 GRUNDLAGEN UND HINTERGRUND .....	9
1.2 ZELLULÄRE MECHANISMEN DER IMMUNANTWORT .....	10
1.3 FRAGESTELLUNG .....	14
<b>2 HYPOTHESEN UND ZIELSETZUNG DER STUDIE .....</b>	<b>15</b>
<b>3 MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>16</b>
3.1 STUDIENDESIGN .....	16
3.1.1 Patientenkollektiv .....	16
3.1.2 Versuchsaufbau .....	17
3.2 UNTERSUCHUNGSMETHODEN .....	19
3.2.1 Gewinnung von Probenmaterial.....	19
3.2.1.1 Methodik .....	19
3.2.1.2 Material.....	20
3.2.2 Isolation von peripheren mononuklearen Blutzellen (PBMCs).....	20
3.2.2.1 Methodik .....	20
3.2.2.2 Material .....	21
3.2.3 Immunomagnetische Zellsortierung .....	22
3.2.3.1 Prinzip.....	22
3.2.3.2 Methodik .....	24
3.2.3.3 Material .....	26
3.2.4 Zellkultur und Stimulation.....	26
3.2.4.1 Prinzip.....	26
3.2.4.2 Methodik .....	27
3.2.4.3 Material .....	28
3.2.5 Verwendete Leukämiezelllinien.....	29
3.2.6 Durchflusszytometrie.....	29
3.2.6.1 Prinzip.....	29
3.2.6.2 Methodik .....	31
3.2.6.3 Material .....	32
3.2.7 Multi-Plex-Assay .....	33
3.2.7.1 Prinzip.....	33
3.2.7.2 Methodik .....	34

3.2.7.3 Material .....	35
3.3 STATISTIK .....	36
<b>4 ERGEBNISSE .....</b>	<b>37</b>
4.1 ZELLSPEZIFISCHE OBERFLÄCHENMARKER.....	37
4.1.1 Expression T-Zell spezifischer Oberflächenantigene .....	38
4.1.2 Expression APC-spezifischer Oberflächenantigene .....	39
4.2 ZYTOKINE .....	40
4.2.1 Sekretion T-Zell spezifischer Zytokine zur Beurteilung der APC- Funktion .....	40
4.2.1.1 Postoperative Sekretion T-Zell spezifischer Zytokine.....	41
4.2.1.2 Sekretion T-Zell spezifischer Zytokine bei Sepsis .....	44
4.2.2 Sekretion Monozyten-spezifischer Zytokine zur Beurteilung der T-Zellfunktion .....	47
4.2.2.1 Postoperative Sekretion APC-spezifischer Zytokine .....	48
4.2.2.2 Sekretion APC-spezifischer Zytokine bei Sepsis.....	51
<b>5 DISKUSSION .....</b>	<b>54</b>
5.1 FRAGESTELLUNG .....	54
5.2 T-ZELLEN UND ANTIGENPRÄSENTIERENDE ZELLEN ALS TEIL DER POSTOPERATIVEN IMMUNREAKTION .....	55
5.2.1 Spezifische Zellaktivierung.....	55
5.2.1 Bestimmung von Oberflächenmarkern prä- und postoperativ.....	56
5.2.2 Zytokinsekretion als funktioneller Marker .....	57
5.3 BIO-ASSAY .....	58
5.4 INTERPRETATION DER GEWONNENEN ERGEBNISSE.....	60
5.4.1 Expression von Oberflächenmarkern .....	60
5.4.2 Isolierte Betrachtung von regulatorischen T-Zellen (T <sub>reg</sub> ) und <i>Myeloid</i> <i>Derived Suppressor Cells</i> (MDSCs).....	61
5.4.3 Sekretion von Zytokinen.....	63
5.5 THEORIE EINES „SECOND HIT“ .....	65
5.6 KLINISCHE RELEVANZ .....	66

5.7	AUSBLICK .....	66
<b>6</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>68</b>
<b>7</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>69</b>
<b>8</b>	<b>DANKSAGUNG .....</b>	<b>78</b>
<b>9</b>	<b>LEBENS LAUF.....</b>	<b>FEHLER! TEXTMARKE NICHT DEFINIERT.</b>
<b>10</b>	<b>EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG.....</b>	<b>79</b>

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abb.	Abbildung
APC	<i>Antigen Presenting Cells</i> / Allophycocyanin
BSA	bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	<i>circa</i>
CARS	<i>Compensatory Antiinflammatory Response Syndrome</i>
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
CRP	C-reaktives Protein
Cy 5.5	Cyanin 5.5
°C	Grad Celsius
EDTA	Ethylen-Diamin-Tetra-Acetat
et al.	<i>et altera</i>
FACS	<i>Fluorescence Activated Cell Sorter</i>
FcR	<i>Fragment Crystallisable Receptor</i>
FCS	<i>Fetal Calf Serum</i>
FITC	Fluoreszeinisothiozyanat
FL-1,-2,-3,-4	Fluoreszenz 1, 2, 3, 4
FSC	<i>Forward Scatter</i>
g	Gramm
× g	Vielfaches der Erdbeschleunigung
GM-CSF	<i>Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor</i>
h	Stunde
HBSS	<i>Hank's Buffered Salt Solution</i>
HLA-	<i>Human Leukocyte Antigene</i>
IFN-γ	Interferon-gamma
IgG	Immunglobulin G
IL-1β,-2,-6,-10	Interleukin -1β,-2,-6,-10,
LBP	<i>Lipopolyssacharide Binding Protein</i>
LPS	Lipopolysaccharid
μl	Mikroliter
MACS	<i>Magnetic Cell Sorting</i>
MDSC	<i>Myeloid Derived Suppressor Cells</i>
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i>

Min.	Minute
ml	Milliliter
MOF	<i>Multiple Organ Failure</i>
nm	Nanometer
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
PBMC	<i>Peripheral Mononuclear Blood Cells</i>
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PE	Phycoerythrin
PerCP	Peridinin Chlorophyll
PGE2	Prostaglandin E2
RPMI-1640	<i>Roswell Park Memorial Institute 1640</i>
RT	Raumtemperatur
SIRS	<i>Systemic Inflammatory Response Syndrome</i>
SSC	<i>Side Scatter</i>
Th-1,-2 Zellen	T-Helferzellen
TCR	T-Zell Rezeptor
TNF	Tumornekrosefaktor
T <sub>reg</sub>	regulatorische T-Zellen
u.a.	unter anderem
vs.	<i>versus</i>
Well	Vertiefung in Zellkulturplatten



# 1 EINLEITUNG

## 1.1 GRUNDLAGEN UND HINTERGRUND

Das menschliche Immunsystem schützt den Organismus vor der Entstehung von Infektionskrankheiten durch die Bekämpfung verschiedenster Erreger. Dabei unterscheidet man prinzipiell in eine spezifische und eine unspezifische Immunantwort. Während die spezifische Immunantwort eine zielgerichtete Abwehr gegen bereits bekannte Erreger und deren Antigene darstellt, ist die unspezifische Immunantwort, die zumal von Geburt an besteht, eine Reaktion unabhängig von der Beschaffenheit des Antigens. Neben der Bekämpfung von Erregern dient das angeborene Immunsystem auch der Regulation erweiterter inflammatorischer Reaktionen nach Weichteil- und Gewebsverletzungen, Zelltod sowie der Reduzierung der Anfälligkeit für sekundäre oder opportunistische Infektionen. (1–5).

Voraussetzung einer funktionierenden Immunantwort ist ein komplexes Zusammenspiel von verschiedenen Zellen und Mediatoren. In einer zentralen Rolle für den koordinierten Ablauf der Abwehrkaskade sind unter anderem Zytokine verantwortlich. Die an der Immunabwehr beteiligten Zellen schütten diese Proteine und Glykoproteine als chemische Botenstoffe zur Regulierung der Abwehrreaktion aus. Die Zytokine spielen dabei in zahlreichen Prozessen wie z. B. beim Zellwachstum, bei der Zelldifferenzierung und beim Auf- und Umbau von Gewebe eine große Rolle (6). Unter anderem kann deren Ausschüttung die Entstehung einer systemischen Entzündungsreaktion (*Systemic Inflammatory Response Syndrome*, SIRS) (7) einleiten, die die Folge von Trauma und hämorrhagischen Schock, aber auch von abdominalchirurgischen Eingriffen sein kann (8).

Die Entstehung eines SIRS als physiologische Reaktion auf ein Trauma, hervorgerufen durch einen operativen Eingriff, kann im weiteren Verlauf in schwerwiegende Komplikationen, wie z.B. eine generalisierte Entzündungsreaktion (Sepsis) mit Multiorganversagen (*Multiple Organ Failure*, MOF), münden. (4,8,9). Dabei lösen, durch das verursachte Trauma stimuliert, ortsansässige Makrophagen eine „Akute Phase Reaktion“ aus (10), die mit der massiven Ausschüttung und Ausschwemmung von proinflammatorischen Zytokinen einhergeht. Im Falle von kleineren Traumata dient diese Reaktion des Immunsystems der lokalen Regulierung der Wundheilung (11). Bei schwereren Verletzungen allerdings führt dieser Konzentrationsanstieg im weiteren Verlauf und unter der Einwirkung weiterer Mediatoren (z.B. vasoaktive Substanzen wie

Prostaglandine) zu einer generalisierten Minderperfusion und Hypoxie und einer damit verbundenen organischen Dysfunktion, insbesondere von Niere, Leber und Herz (7,12,13).

Zahlreiche Studien zeigen, dass eine Störung der natürlichen Abwehrfunktion als direkte Folge des Traumas eine zentrale Rolle bei dieser Entwicklung spielt (8,14,15).

Allerdings kommt es bei diesem Vorgang nicht nur zur Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine, sondern auch zur Sekretion von Botenstoffen, die eine immunsuppressive Wirkung haben, wie z.B. Interleukin 10 (IL-10) oder Prostaglandin E2 (PGE2). Damit ergibt sich im Verlauf der körpereigenen Abwehrfunktion ein Nebeneinander von Hyperinflammation (SIRS) und einer Reaktion zur Kompensation, die als *Compensatory Antiinflammatory Response Syndrome* (CARS) bezeichnet wird (10,16). Mit dieser Reaktion sollen Reparaturmechanismen eingeleitet und der überschießenden Reaktion der Hyperinflammation entgegengewirkt werden. Überraschenderweise führt dies im weiteren zeitlichen Verlauf zu vermehrter Gewebsdestruktion und Infektanfälligkeit (10).

## 1.2 ZELLULÄRE MECHANISMEN DER IMMUNANTWORT

Ein Fokus liegt dabei auf der Interaktion von T-Zellen und antigenpräsentierenden Zellen (*Antigen Presenting Cells*; APCs), die einen ersten Schritt im Ablauf der Abwehrkaskade darstellt. Dabei kommt es zur Präsentation von körperfremden Antigenen auf der Oberfläche von APCs, zu denen u.a. die dendritischen Zellen und Makrophagen gehören, und die zur Phagozytose in der Lage sind (17).

Bei diesem Vorgang sind bereits eine Reihe von Mediatoren identifiziert worden, die in einem engen Zusammenspiel die geregelte Abwehrfunktion aufrecht erhalten. Spezifische Zytokine, die dabei von T-Zellen ausgeschüttet werden, sind Interleukin 2 (IL-2) und Interferon gamma (IFN- $\gamma$ ). Der Tumornekrosefaktor alpha (TNF- $\alpha$ ), Interleukin 1 beta (IL-1 $\beta$ ) und Interleukin-6 (IL-6) sind Zytokine, die vermehrt von APCs sezerniert werden. Interleukin 10 (IL-10) und der *Granulocyte Monocyte Stimulating Growth Factor* (GM-CSF) sind wiederum Zytokine, die von beiden Zelltypen produziert und sezerniert werden. Unterschieden werden diese Botenstoffe noch in proinflammatorische Zytokine (IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , GM-CSF) und antiinflammatorische Zytokine (IL-10) (18). Während einer stattfindenden Immunreaktion liegen diese Zytokine physiologischerweise in einem Verhältnis vor, das zu Beginn der Reaktion zur Seite der

proinflammatorischen Zytokine verschoben ist. Im weiteren zeitlichen Verlauf der Abwehrreaktion verschiebt sich dieses Verhältnis weiter zu den antiinflammatorischen Botenstoffen (3,10,18–23).

Zudem stehen die zelluläre und humorale Immunantwort in einem ständigen Gleichgewicht, das entsprechend der beteiligten Untergruppen aus T-Helferzellen als Th1/Th2-Balance bezeichnet wird. Dabei regen ausdifferenzierte Th1-Helferzellen die zelluläre Immunantwort an, während die humorale Immunantwort durch Th2-Helferzellen gesteuert wird. Eine Verlagerung der Immunantwort hin zu einer Th1- oder Th2-dominanten Antwort wird als Th1/Th2-*shift* bezeichnet und dient einer Optimierung der Immunantwort gegenüber verschiedener exogener Krankheitserreger. Zentrale Botenstoffe dieser Entwicklung stellen dabei unter anderem IFN- $\gamma$  und IL-10 dar (24,25).

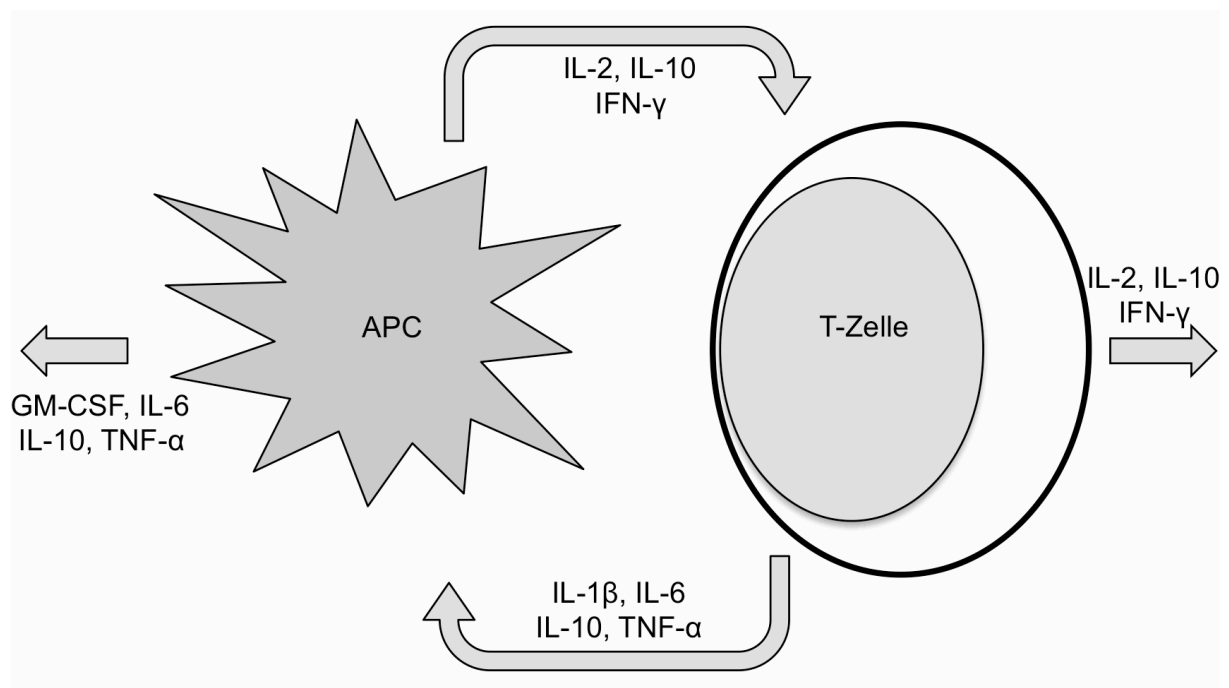


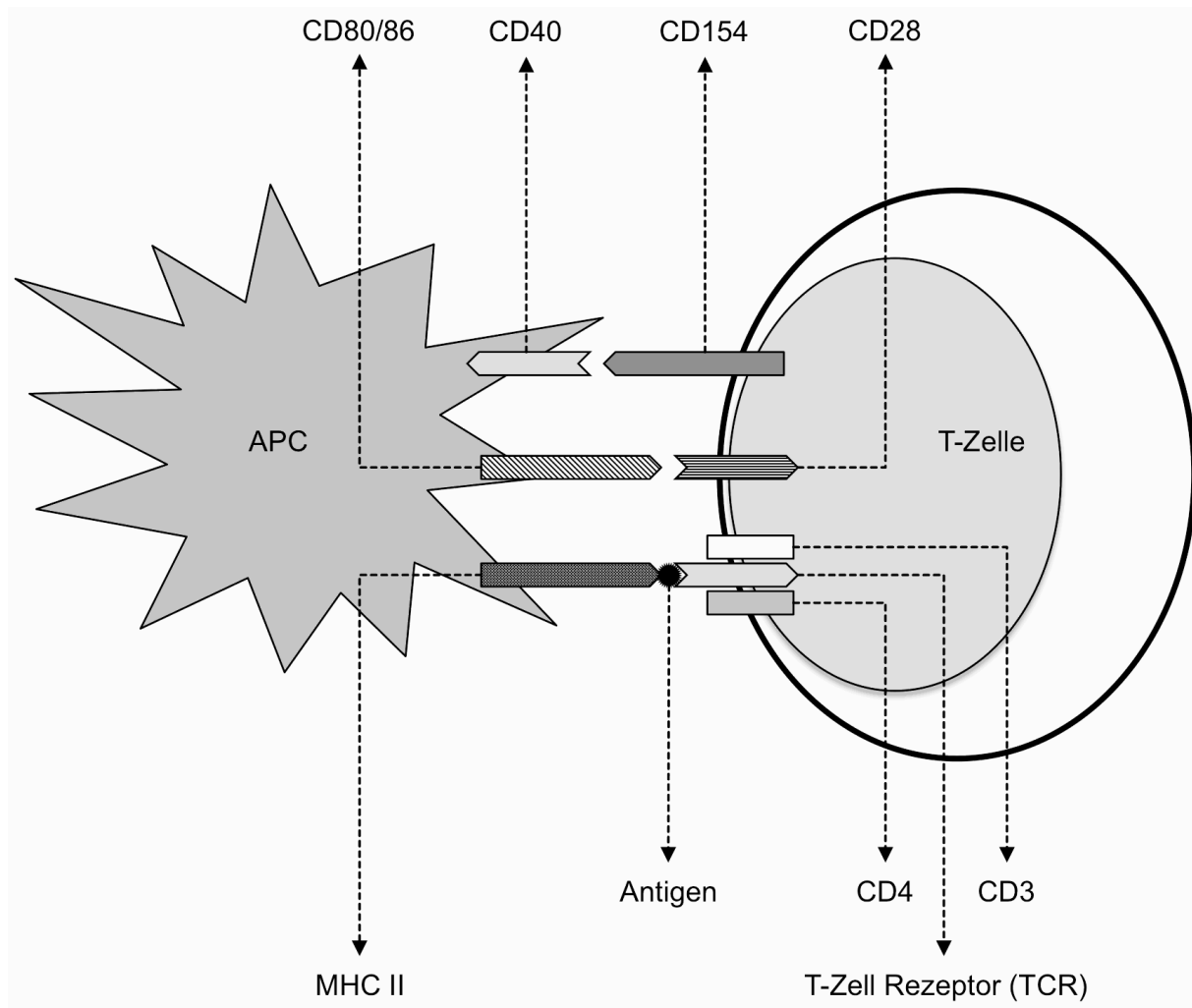
Abb.1: Darstellung der Produktion von pro- und antiinflammatorischen Zytokinen und deren unterschiedliche Wirkungsorte (T-Zellen, APCs sowie anderes Körpergewebe).

Eine weitere wichtige Rolle bei der Interaktion von Zellen spielen außerdem verschiedene Proteine auf der Zelloberfläche, die u.a. als Rezeptoren für Zytokine oder Träger von Antigenfragmenten dienen. Die Expression dieser Proteine, die u.a. im sogenannten *cluster of differentiation* (CD) kategorisiert werden (3), wird dabei sowohl von der Interaktion mit anderen Zellen, als auch durch Ereignisse wie Trauma und Schock, vergleichbar mit der Sekretion von Zytokinen, beeinflusst.

In den Organismus eingedrungene Krankheitserreger werden von APC (Makrophagen, dendritische Zellen u.a.) phagozytiert. Das aufgenommene Antigen wird

im Folgenden im Zellinneren gespalten und die einzelnen Peptidfragmente zur Präsentation an die Zelloberfläche verbracht. Mittels des *Major Histocompatibility Complex II* (MHC II) stehen diese körperfremden Antigene nun zur Erkennung durch T-Helferzellen bereit. Über den Proteinkomplex aus T-Zellrezeptor (*T-Cell Receptor*, TCR), CD3 und CD4 ist die T-Helferzelle nun in der Lage zur Kommunikation mit der APC und zur Erkennung des präsentierten exogenen Antigens (26–28). Diese Erkennung des Antigens über den TCR ist ein erstes entscheidendes Signal zur Aktivierung von T-Zellen durch APC (29). Zytotoxische T-Zellen, die zur Erkennung endogener Antigene fähig sind, bekommen diese über den MHC I präsentiert, den außer den Erythrozyten jede Körperzelle trägt. Zur Erkennung nutzt die T-Zelle in diesem Fall den Proteinkomplex aus TCR und CD8 (30).

Aber die Antigenpräsentation alleine reicht zur vollständigen Aktivierung der T-Zelle nicht aus. Costimuli aus dem umgebenden Milieu, besonders die Bindung von CD80 und CD86 an das T-Zellmolekül CD28, liefern ein notwendiges zweites Signal (z.B. zur Initiierung der IL-2 Synthese). Die T-Zelle antwortet unter anderem mit der Expression von CD154, das der Ligand zu CD40 auf der Oberfläche der APC ist, und treibt so die weitere Aktivierung, Proliferation und Differenzierung voran (31,32).



*Abb.2: Schematische Darstellung der Antigenpräsentation durch APC und der damit stattfindenden Interaktion mit der T-Zelle*

Daneben existieren noch weitere Oberflächenmarker auf der T-Zelloberfläche wie CD69, ein weiterer zu Beginn der Zellaktivierung exprimierter Costimulator, oder CD25 und CD127, die als Zytokinrezeptoren fungieren. CD 127 ist dabei Rezeptor von Interleukin 7 (IL-7), ein zentraler Mediator bei der Regulierung von T- und B-Zellentwicklung. CD14 dient den APCs als Rezeptor für Lipopolysaccharide (LPS), die als Zellwandbestandteile von gram-positiven Bakterien einen stimulierenden Effekt auf das Immunsystem haben. Und CD16, ebenfalls ein Marker von APC, fungiert als Rezeptor für Antikörper und vermittelt darüber die Zerstörung von bereits detektierten Erregern (33–37).

Verschiedene Studien weisen einen Defekt dieser Antigenpräsentation nach Trauma und hämorrhagischen Schock sowie nach abdominell-chirurgischen Eingriffen nach (26,38,39). Aus diesen Erkenntnissen konnte bereits ein direkter Zusammenhang zur postoperativen Immunsuppression nach abdominalchirurgischen Eingriffen

hergestellt werden (40). Zytokine sind dabei an der Kontrolle der Antigenpräsentation beteiligt, wobei IFN- $\gamma$  und GM-CSF einen stimulierenden Effekt auf die APC zeigen. IL-1 $\beta$ , IL-6 und TNF $\alpha$  regen die Proliferation, Ausdifferenzierung und weitere Zytokinsekretion der beteiligten Zellen an. IL-2, das von APCs sezerniert wird, wirkt über seinen hochaffinen Rezeptor auf die Proliferation und Differenzierung von T-Zellen. Einzig IL-10 hat auf nahezu alle Funktionen von Immunzellen einen hemmenden Einfluss (41–46).

Das komplexe Zusammenspiel aus verschiedenen Mediatoren und den co-stimulierenden Effekten der von den beteiligten Immunzellen exprimierten Oberflächenmarker wird als Immunologische Synapse bezeichnet (47,48). Eine Störung dieser Interaktion zieht erwartungsgemäß einen kompromittierenden Effekt auf die Immunantwort nach sich, der eine Erhöhung der Gefahr postoperativer Infektionen und Sepsis zur Folge haben kann (4,16). *Walz et al* zeigten in tierexperimentellen Studien, dass eine gestörte T-Zellfunktion dafür ausschlaggebend sein könnte (49). Dabei wurde eine verminderte Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine nach Trauma und Blutverlust durch T-Zellen beobachtet. Des Weiteren wurde nach Cokulturen von postoperativen T-Zellen mit nativen APCs *in vitro* eine verminderte Expression von MHC II Molekülen auf der Oberfläche der APCs gemessen.

### 1.3 FRAGESTELLUNG

Nach großen abdominalchirurgischen Eingriffen kommt es zur Suppression der natürlichen Immunantwort, welche die Infektanfälligkeit der Patienten erhöht und zu einer Sepsis mit letalem Multiorganversagen führen kann.

In dieser Arbeit soll der Frage nachgegangen werden, welcher Zelltyp für diese Immunsuppression primär verantwortlich ist und wie sich die zelluläre Immunkompetenz in der Sepsis von der frühen postoperativen Phase unterscheidet.

## 2 HYPOTHESEN UND ZIELSETZUNG DER STUDIE

Aufgrund der Ergebnisse vorangegangener Studien ist eine weitreichende Störung der Immunantwort, ausgehend von einem Funktionsdefekt der T-Zelle, zu erwarten.

Es wird angenommen, dass sowohl eine verminderte Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine als auch eine Störung der direkten Zellinteraktion dafür verantwortlich sein könnten.

Ziel dieser Studie war es, den Effekt von abdominalchirurgischen Eingriffen auf die Funktionalität des Immunsystems von humanen Patienten *in vitro* zu untersuchen. Dabei sollte insbesondere der Effekt auf die Interaktion von T-Zellen und APCs beurteilt werden und die Hypothese einer zellvermittelten Immunsuppression untersucht werden.

## 3 MATERIAL UND METHODEN

### 3.1 STUDIENDESIGN

Die Untersuchung wurde geplant als ein prospektives klinisch experimentelles Modell, bei dem *in vitro* die Funktionen von T-Zellen und APCs abdominalchirurgischer sowie septischer Patienten untersucht wurden.

#### 3.1.1 PATIENTENKOLLEKTIV

Als Einschlusskriterium zu dieser Studie galt ein bevorstehender, bzw. im Falle der septischen Patienten ein stattgefundener, abdominalchirurgischer Eingriff mit entsprechend großem Weichteiltrauma. Um ein möglichst homogenes Patientenkollektiv zu erhalten, wurden dazu Eingriffe des oberen Gastrointestinaltraktes, der Leber sowie der Bauchspeicheldrüse ausgewählt.

Zudem galten bei der Auswahl der septischen Patienten der momentane klinische Zustand des Patienten unter Einschätzung eines erfahrenen Intensivmediziners sowie die aktuellen Blutwertparameter von IL-6, C-reaktives Protein (CRP), Pro-Calcitonin sowie die Leukozytenzahl im peripheren Blut. (50,51).

Die Ausschlusskriterien zur Teilnahme an der Studie waren sowohl für abdominalchirurgische als auch septische Patienten wie folgt:

- Alter < 18 Jahre und > 80 Jahre
- BMI > 30
- Chronische oder akute Entzündungskrankheit (z.B. chronische/akute Pankreatitis oder Hepatitis)
- Einnahme von Immunsuppressiva < 8 Wochen vor Beginn der Studie
- Chemotherapie < 6 Monate vor Beginn der Studie
- Leberzirrhose

Zu dieser Studie wurden Patienten rekrutiert, die sich zwischen April 2010 und April 2012 einem größeren abdominalchirurgischen Eingriff unterziehen mussten. Insgesamt nahmen vier Frauen und sieben Männer an der Studie teil. Außerdem wurden im selben Zeitraum Patienten, die sich aufgrund der Behandlung einer akuten Sepsis nach einem abdominalchirurgischen Eingriff auf der Intensivstation befanden, in die Studie mit aufgenommen. Zusammen mit diesem einen weiblichen und fünf



männlichen Probanden ergab sich eine Gesamtzahl von 17 Studienteilnehmern. Alle Studienteilnehmer waren in diesem Zeitraum Patienten der chirurgischen Klinik und Poliklinik der Ludwig-Maximilians-Universität München, Campus Großhadern. Alle Patienten wurden vor der Probenentnahme über die Studie aufgeklärt und gaben ihr Einverständnis zur Teilnahme.

### 3.1.2 VERSUCHSAUFBAU

Zur Bestimmung der einzelnen Zellfunktionen wurde von verschiedenen Patientenkollektiven Gewebe (Vollblut) gewonnen, aus dem T-Zellen und APCs isoliert wurden. Im Anschluss an die Isolation wurden die gewonnenen Zellpopulationen mit verschiedenen standardisierten Zellgruppen in Cokultur gebracht, stimuliert, 24 Stunden inkubiert und die Überstände abgenommen. Als standardisierte Zellgruppen dienten zum einen Zellen, die aus dem Vollblut eines gesunden Kontrollpatienten gewonnen wurden; zum anderen Zellen aus zwei kultivierten Leukämiezelllinien.

In der Cokultur wurden stets CD3+ Zellen im Verhältnis 1:1 mit CD14+ Zellen vermischt. Eine genaue Übersicht über die verwendeten Zellen folgt unter 3.2.5.

Daraus ergaben sich für das Patientenkollektiv folgende Charakteristika:

	Abdominalchirurgische Patienten (N=11)	Septische Patienten (N=6)
<b>Medianes Alter</b>		
Jahre	62,5 (31,0-76,0)	63,5 (63,0-69,0)
<b>Geschlecht</b>		
Männlich	7 (63,6 %)	5 (83,3 %)
Weiblich	4 (36,4 %)	1 (16,7 %)
<b>Art des chirurgischen Eingriffs</b>		
Hemihepatektomie	5 (45,5 %)	-
Gastrektomie	1 (9,0 %)	-
Ösophagoektomie	2 (18,2 %)	-
OP nach Whipple	3 (27,3 %)	-
<b>OP Parameter (Median)</b>		
OP-Dauer (Minuten)	277,5 (144,0-453,0)	-
Blutverlust (ml)	1300,0 (800,0-3350,0)	-
Noradrenalin (mg/h)	0,5 (0,3-2,0)	-
<b>Sepsis Parameter (Median)</b>		
CRP (mg/dl)	-	17,9 (5,9-34,7)
Leukozyten (G/l)	-	19,9 (6,0-35,0)
IL-6 (pg/ml)	-	389,0 (39,2-1348,0)
Pro-Calcitonin (ng/dl)	-	1,9 (0,4-18,3)

*Tab.1: Übersicht über die Charakteristika aller 17 in die Studie aufgenommenen Patienten.*

## 3.2 UNTERSUCHUNGSMETHODEN

Zur Beurteilung der Einflüsse auf das gewonnene Gewebe kamen verschiedene experimentelle Techniken zum Einsatz, die im folgenden genauer erörtert werden.

### 3.2.1 GEWINNUNG VON PROBENMATERIAL

Das für die Untersuchung benötigte Blut wurde stets direkt vor dem operativen Eingriff und zwei Stunden postoperativ abgenommen.

Im Falle der Patientengruppe mit bestehender Sepsis wurde das Blut zu einem Zeitpunkt abgenommen, bei dem die unter 3.1.1 und in Tabelle 1 beschriebenen Kriterien erfüllt waren.

#### 3.2.1.1 METHODIK

Das für die Studie benötigte Blut der operativen Patienten wurde jeweils über den zentralen Venenkatheter bzw. den arteriellen Katheter entnommen, der während der OP-Vorbereitung unter sterilen Bedingungen gelegt worden war. Dazu wurden vier standardisierte heparanisierte Blutröhren à 9ml Volumen verwendet. Das gewonnene Probenmaterial (Gesamtvolumen 36ml) wurde bis zur weiteren Verarbeitung (< 30 Minuten) auf Eis gelagert.

Die Blutentnahme bei septischen Patienten erfolgte analog nach gründlicher Desinfektion über einen zentralen Venenkatheter oder einen arteriellen Verweilkatheter.

Im Falle des Kontrollpatienten wurde das Probenmaterial nach Desinfektion mittels Punktion einer peripheren Armvene entnommen.

### 3.2.1.2 MATERIAL

Gerät / Material	Herkunft / Firma
Heparinisierte Blutentnahmeröhrchen 9ml S-Monovette®	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Multi-Adapter Luer	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Blutabnahmekanüle Safety-Multifly®-Kanüle	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Desinfektionsspray	Bode Chemie, Hamburg, Deutschland
Tupfer	Lohmann & Rauscher, Neuwied, Deutschland

### 3.2.2 ISOLATION VON PERIPHEREN MONONUKLEAREN BLUTZELLEN (PBMCs)

Aus dem gewonnenen Gewebe wurden anschließend die peripheren mononukleären Blutzellen (*Peripheral Mononuclear Blood Cells*, PBMCs) zur weiteren Verarbeitung isoliert (52).

#### 3.2.2.1 METHODIK

Die Isolation der PBMCs erfolgte über einen Dichtegradienten durch Ficolltrennung. Dazu wurde das Volumen des gewonnenen Vollbluts gedrittelt und anschließend mit *Hank's Buffered Salt Solution* (HBSS) jeweils auf ein Gesamtvolumen von 35ml aufgefüllt. Die entstandene verdünnte Blutlösung wurde in einem 50ml-Zentrifugationsröhrchen vorsichtig auf 15ml Ficoll-Lösung aufpipettiert. Es folgte die Zentrifugation über 20 Minuten mit  $650 \times g$  bei Raumtemperatur. Die entstandene *Monolayer*-Zellschicht wurde aufgenommen und einmalig mit 50ml HBSS-Lösung bei  $840 \times g$  und  $4^{\circ}\text{C}$  10 Minuten lang gewaschen. Der Waschvorgang wurde ein zweites Mal bei geringerer Zentrifugation ( $470 \times g$ ,  $4^{\circ}\text{C}$ , 10 Minuten) wiederholt. Die gewonnenen PBMCs wurden anschließend gezählt und zur weiteren Verarbeitung auf Eis gelagert.

$5 \times 10^6$  der gewonnenen PBMCs wurde zur späteren flowzytometrischen Analyse separiert und ebenfalls auf Eis gelagert.

Dieses Verfahren wurde analog bei der Gewinnung von Patientenzellen und Kontrollzellen angewandt.

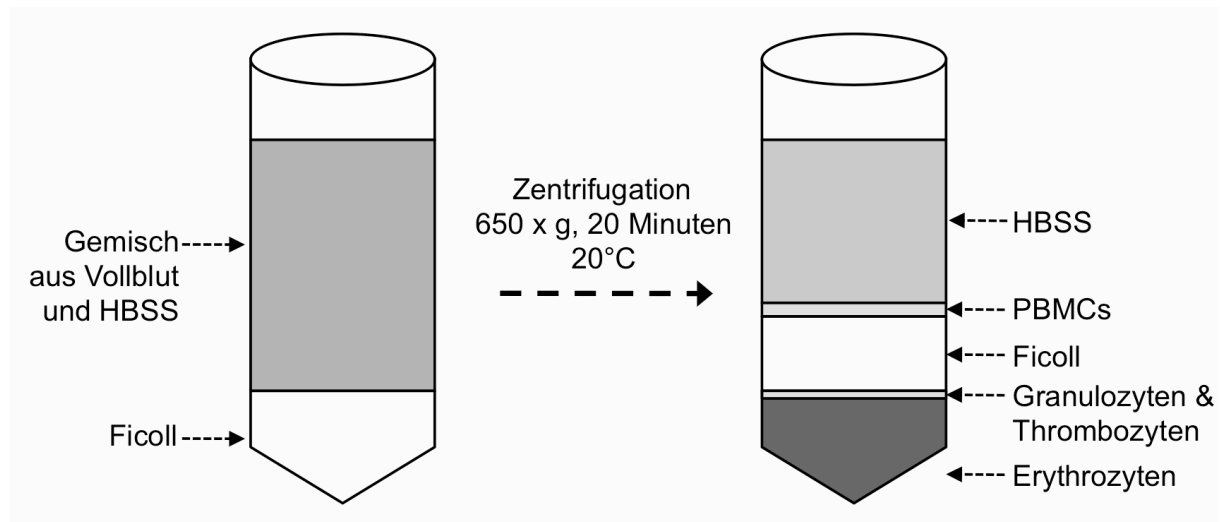


Abb.3: Schematische Darstellung der Gewinnung von PBMCs mittels Ficoll-Trennung

### 3.2.2.2 MATERIAL

Gerät / Material	Herkunft / Firma
Biocoll Separation Solution	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
HBSS	Lonza, Walkersville, MD, USA
Zentrifugenröhrchen 50ml	BD Falcon, Durham, NC, USA
Trypanblau	SIGMA-ALDRICH, Steinheim, Deutschland
Zellzählkammer nach Neubauer	Karl Hecht KG, Sondheim, Deutschland
Pipettierhilfe „Pipetboy“	Integra Biosciences,
Handpipetten (10µl, 100µl, 200µl und 1000µl)	Gilson, Villiers-le-Bel, Frankreich
Sterile Pipettenspitzen (5ml, 10ml und 25ml)	Costar, Corning, NY, USA
Sterile Pipettenspitzen (10µl, 100µl, 200µl und 1000µl)	Gilson, Villiers-le-Bel, Frankreich
Mikroskop „Axioskop“	Zeiss, Jena, Deutschland
Zellsieb (70µm)	BD Falcon, Durham, NC, USA
Zentrifuge „Rotina 420R“	Hettich, Tuttlingen, Deutschland
Arbeitsbank „HERA safe“	Thermo scientific, Langenenselbold, Deutschland

### 3.2.3 IMMUNOMAGNETISCHE ZELLSORTIERUNG

Zur Isolierung der CD3+ und CD14+ Zellpopulationen aus den PBMCs wurde die immunomagnetische Zellsortierung (*Magnetic Cell Separation, MACS*) der Firma Miltenyi angewandt (53).

#### 3.2.3.1 PRINZIP

Dieses Prinzip basiert auf der Verwendung von *MACS-Microbeads* zur Separation einzelner Zellgruppierungen. Dabei handelt es sich um magnetische Partikel, die zunächst mittels spezifisch bindender monoklonaler Antikörper auf die Zellen aufgebracht werden. Zur Differenzierung der einzelnen Zellpopulationen wird dabei auf die Expression spezifischer Oberflächenantigene (*Cluster of Differentiation, CD*) zurückgegriffen.

Es wurden dabei Antikörper gegen CD3 (T-Zellen) sowie gegen CD14 (APCs) in zwei voneinander getrennten Separationsverfahren verwendet.

Nach Aufbringen des Antikörpers wird die Zellsuspension in ein *MACS Separation Column* überführt, das einen Durchfluss der Zellen durch ein starkes Magnetfeld erlaubt. Dabei blieben alle Zellen im Magnetfeld haften, die mit den entsprechenden *Microbeads* markiert worden waren. Nach dreimaligem Spülen mit *MACS-Buffer* wird die Säule aus dem Magnetfeld entfernt und die mit Antikörpern markierten Zellen können separat in einem Zellkulturröhrchen aufgefangen werden. Diese Art der Separation wird als Positivselektion bezeichnet.

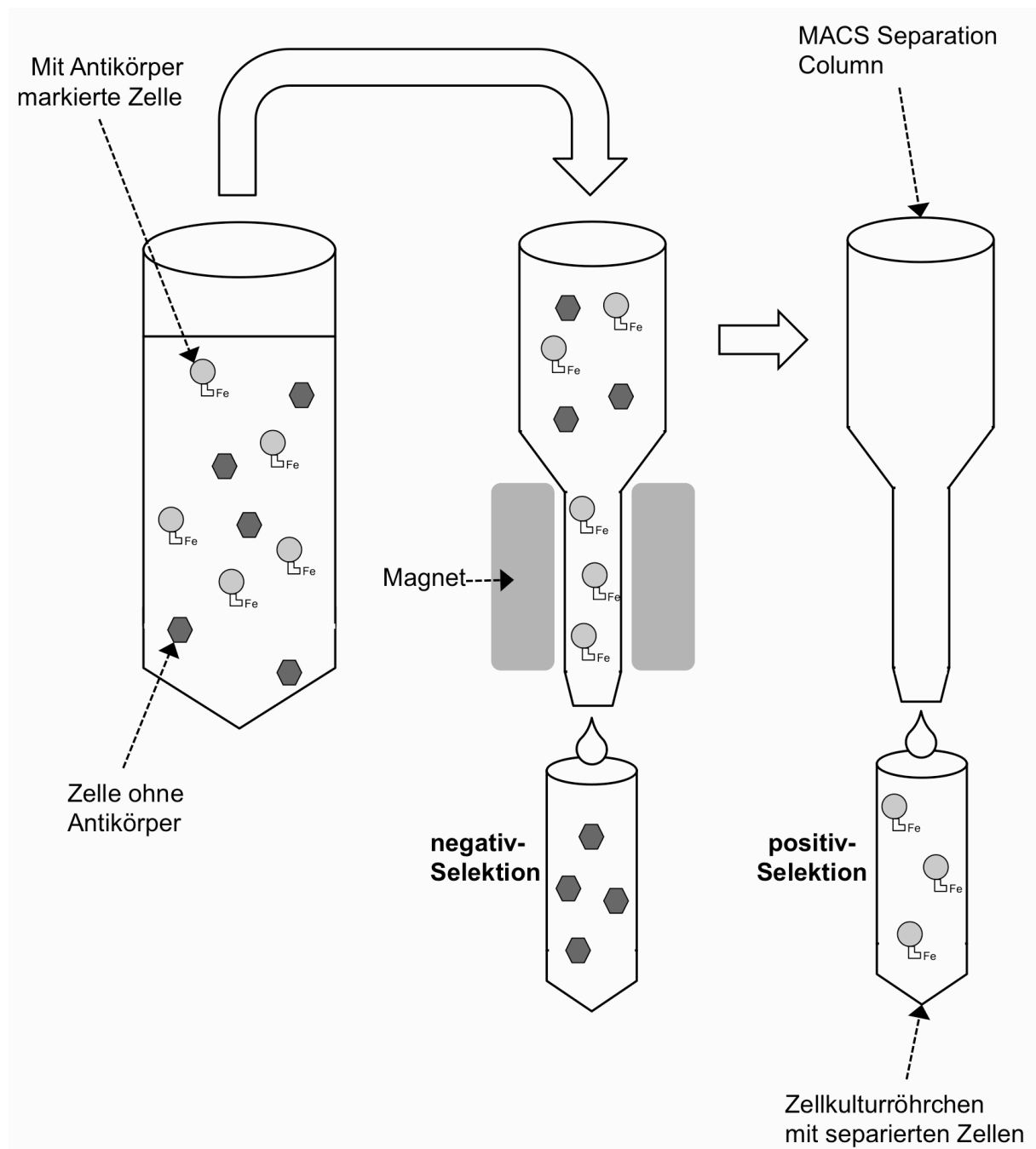


Abb.4: Schematische Darstellung des Zellisolationsprinzips mittels MACS-Microbeads

### 3.2.3.2 METHODIK

Die im vorangegangenen Schritt gewonnenen PBMCs wurden nun abzentrifugiert

(300 × g, 10min, RT), der Überstand vollständig verworfen und im dafür vorgesehenen *MACS-Buffer* (80µl Puffer /  $10 \times 10^6$  Zellen) resuspendiert. Nach Zugabe des CD14-Antikörpers (10µl Antikörper-Lösung /  $10 \times 10^6$  Zellen) wurden die Zellen für 15 Minuten bei 4°C inkubiert.

Im Anschluss daran wurde die Zellsuspension gewaschen, wobei 3-5ml *MACS-Buffer* zugegeben und nochmals abzentrifugiert (300 × g, 10min, RT) wurde. Nun wurden die Zellen in 500µl *MACS-Puffer* abermals resuspendiert und in eine *MACS Separation Column* überführt.

Die Trennsäule war zuvor in einem magnetischen Feld (*MACS Cell Separator*) platziert und mit 500µl *MACS-Buffer* gespült worden. Ein Zellkultur Röhrchen wurde zum Auffangen der unmarkierten Zellen unter der Säule platziert.

Nach vollständigem Durchlaufen der Zellsuspension durch die *MACS Separation Column* wurde die Säule weitere drei Mal mit je 500µl *MACS-Buffer* gespült.

Erst jetzt wurde die Säule aus dem Magnetfeld entfernt, und die CD14-positiven Zellen konnten mittels eines weiteren Spülvorgangs (1ml *MACS-Buffer*) und der Verwendung eines passenden Spritzenstempels aus der Säule ausgewaschen und in einem separaten Röhrchen aufgefangen werden. Die so gewonnenen Monozyten wurden abzentrifugiert (300 × g, 10min, RT), der Überstand verworfen sowie die Zellen im Zellmedium resuspendiert und gezählt. Die Zellzahl wurde auf  $1 \times 10^6$  / ml eingestellt und die Zellen bis zur weiteren Verwendung auf Eis gelagert.

Diese beschriebenen Arbeitsschritte wurden analog zur Gewinnung der CD3-positiven Zellpopulation durchgeführt. Dabei wurde die zuvor negativ-selektierte Zellpopulation mit dem entsprechenden Antikörper inkubiert und das Separationsverfahren analog durchgeführt.

Der Reinheitsgrad der Zellpopulationen, die durch dieses Verfahren gewonnen wurden, liegt im Mittel über 95% (54) und wurde in dieser Studie durch flowzytometrische Analysen bestätigt.



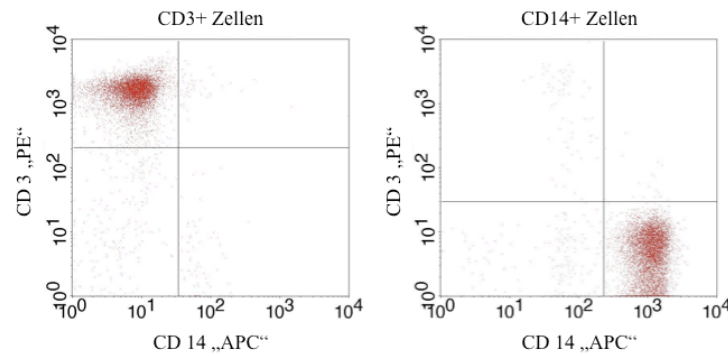












Abb.5: Flowzytometrische Darstellung der, mittels MACS-Microbeads aufgetrennten, Zelllinien. Im linken Bild die Darstellung der CD3-positiven Zellen, rechts die CD14-positive Population.

Dieses Verfahren wurde sowohl für die Zellen des operativen Patienten als auch für die Zellen des Kontrollpatienten angewandt. So standen am Ende der Zellisolation folgende Zellpopulationen für die Cokultur zur Verfügung.

	Prä-OP = nativ	Post-OP = von operierten Patienten	Bei Sepsis = septisch
Chirurgischer Patient = Patient	 <b>APCs</b>	 <b>APCs</b>	 <b>APCs</b>
	 <b>T-Zellen</b>	 <b>T-Zellen</b>	 <b>T-Zellen</b>
Kontrollpatient = Kontrolle	 <b>APCs</b>		
	 <b>T-Zellen</b>		
Leukämiezelllinie = THP-1 bzw JURKAT D1.1	 <b>APCs</b>		
	 <b>T-Zellen</b>		

Tab.2: Übersicht über die Herkunft der verwendeten Zellen und deren Kondition vor der Cokultivierung.

Die im Folgenden angewandte Benennung der verschiedenen Zellpopulationen zur Cokultur erschließt sich aus den Angaben in Tab.2.

### 3.2.3.3 MATERIAL

Gerät / Material	Herkunft / Firma
MACS-Puffer 1000ml PBS + 0,05% BSA + 2mM EDTA	Nach Herstellerangaben selbst produziert
MACS Separation Column	Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, Deutschland
MACS CD3 Microbeads	Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, Deutschland
MACS CD14 Microbeads	Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, Deutschland
MACS Multistand	Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, Deutschland
RPMI 1640	Gibco, Grand Island, NY, USA
Fetal Bovine Serum (FCS)	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Zentrifugierröhrchen 15ml	TPP, Trasadingen, Schweiz

### 3.2.4 ZELLKULTUR UND STIMULATION

Alle gewonnenen Zellpopulationen wurden nach ihrer Isolierung mit Zellen anderer Herkunft in Cokultur gebracht. Dabei wurden stets CD3 positive Zellen mit CD14 positiven Zellen in einem Verhältnis von 1:1 kultiviert.

#### 3.2.4.1 PRINZIP

Im Anschluss an die Isolation der einzelnen Zellreihen wurden diese mit einem Zellkulturmedium auf eine Konzentration von  $1 \times 10^6$  Zellen / ml verdünnt und auf Eis gelagert. Auf einer 24-Wellplatte wurden dann je 500.000 Zellen der beiden verschiedenen Populationen in Cokultur gebracht. Zur Stimulation wurde in Abhängigkeit der zu untersuchenden Zellpopulation entweder Lipopolysaccharid (LPS) zur Stimulation von APCs bzw. Anti-CD3 und Anti-CD28 zur Stimulation der T-Zellen verwendet. Mit dem Anti-CD3 wurden zwei Stunden vor Beginn der Zellkultur die entsprechenden Wells

*gecoatet*. Dazu wurde Anti-CD3 aus einem Vorratsbehälter zu einer Konzentration von 1µg/ml in HBSS verdünnt und je 250µl in das Well gegeben. Nach zwei Stunden wurde die Flüssigkeit abgesaugt und das Well dreimal mit HBSS gespült, bevor es zur Zellkultur bereit stand. Im Falle der Verwendung des LPS und des Anti-CD28 wurde der Stimulus der Zellsuspension direkt zugegeben. Die Konzentration betrug für beide Stimulanzen 10µg/ml.

#### 3.2.4.2 METHODIK

Zu Beginn der Co-Kultivierung standen somit sechs verschiedene Populationen zur Verfügung. Sowohl je drei CD3<sup>+</sup> Populationen (vom operierten Patient, Kontrollpatient und aus der Leukämiezelllinie) als auch drei CD14<sup>+</sup> Populationen des gleichen Ursprungs. Die Zellen wurden in verschiedenen Cokulturen in einer 24-Wellzellkulturplatte über 24 Stunden bei 5% CO<sub>2</sub> und 37°C inkubiert. Dazu wurde jeweils eine Population CD14-positiver APCs mit einer Population CD3-positiver T-Zellen zusammengebracht. Die Gesamtzahl aller Zellen ergab stets  $1 \times 10^6$  in 1ml Zellmedium pro Well. Zur Stimulation der Zellen wurde entweder Lipopolysaccharid (LPS) oder eine Kombination aus anti-CD3 und anti-CD28 verwendet. Im Falle einer Stimulation mit Anti-CD3 wurden die entsprechenden Wells vor dem Einbringen der Zellsuspension mit einem Volumen von je 300µl über zwei Stunden vorab *gecoatet*. LPS und Anti-CD28 wurden der Kultur direkt beigefügt. Eine Übersicht der angewandten Cokulturen ist *Abb.6* zu entnehmen.

Nach 24 Stunden wurden die Zellüberstände abgenommen und zur weiteren Verwendung zu je 300µl aliquotiert und bei -80°C eingefroren.

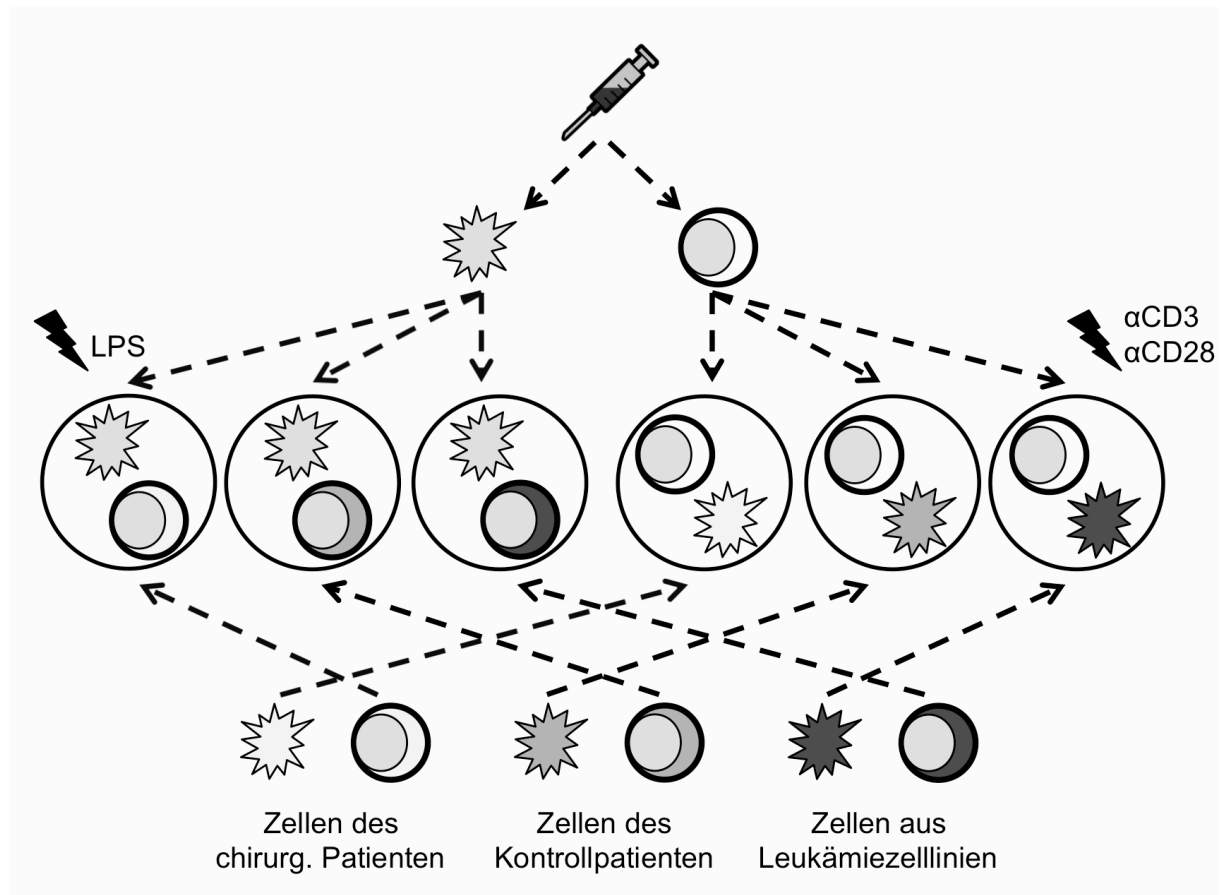


Abb.6: Die erstellten Cokulturen enthielten stets CD3+ sowie CD14+ Zellpopulationen unterschiedlichen Ursprungs. Die Stimulation erfolgte je nach Protokoll mit LPS oder Anti-CD3 mit Anti-CD28. Alle Zellkulturen wurden mit prä- und postoperativ gewonnenen Patientenzellen sowie mit Zellen von septischen Patienten angelegt.

### 3.2.4.3 MATERIAL

Gerät / Material	Herkunft / Firma
24-Wellzellkulturplatte	Nunclon Surface, Nunc, Wiesbaden, Deutschland
Lipopolysaccharid (LPS)	SIGMA-ALDRICH, Steinheim, Deutschland
Anti-CD3	Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, Deutschland
Anti-CD28	Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, Deutschland
Reagenztubes aus Polypropylen, „Eppis“	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Tiefkühlschrank „HERA freeze“	Thermo scientific, Langenenselbold, Deutschland

### 3.2.5 VERWENDETE LEUKÄMIEZELLINIEN

Bei den verwendeten Leukämiezelllinien handelte es sich um humane Monozyten des Stamms THP-1 und humane JURKAT T-Zellen des Stamms D1.1 (ATCC, Manassas, VA, USA). Beide Zelllinien wurden nach Anleitung des Herstellers bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert. Ein Mediumwechsel erfolgte drei Mal pro Woche durch Zentrifugation (125 × g, RT, 7 Minuten) und Neueinstellung der Zellzahl in einer frischen Zellkulturflasche. Die Zellzahlbestimmung erfolgte dabei nach Trypanfärbung in einer Neubauer Zellzählkammer.

Das verwendete Zellkulturmedium wurde nach Anleitung des Herstellers mit 10% *Fetal Calf Serum* (FCS; Gibco, Grand Island, NY, USA) und 0,05% Gentamicin (Lonza, Walkersville, MD, USA) versetzt. Im Falle der Monozyten-Zelllinie wurde dem Medium zusätzlich 0,05% Beta-Mercaptoethanol (SIGMA-Aldrich, Steinheim, Deutschland) beigemischt.

### 3.2.6 DURCHFLUSSZYTOMETRIE

Die Expression spezifischer Oberflächenantigene wurde bei den Zellen der einzelnen Patienten mittels Durchflusszytometrie (im folgenden auch FACS-Analyse) bestimmt (55).

#### 3.2.6.1 PRINZIP

Bei der Durchflusszytometrie handelt es sich um ein lasergestütztes Messverfahren zur qualitativen und quantitativen Beurteilung der Zellmorphologie sowie, nach spezieller Färbung, zur Bestimmung intra- und extrazellulärer Proteinexpression. Dabei wird die Fluoreszenzemission der einzelnen Zellen und die von mittels Antikörpern kovalent gebundenen Farbstoffen nach Bestrahlung mit einem Laser gemessen und ausgewertet.

Die in Suspension befindlichen Zellen werden mittels einer Kapillare im Messbereich angesaugt. Durch die hohe Beschleunigung werden Zellagglutinationen aufgelöst, wodurch gewährleistet wird, dass die Zellen einzeln und nacheinander im Messbereich ankommen und ausgewertet werden können. Im Messbereich werden die Zellen mit einem Laserstrahl der Wellenlänge 488nm bestrahlt.

Die Lichtemission der Zelle erfolgt dabei zum größten Teil nach vorne und wird als Vorwärtsstreulicht (*Forward Scatter*, FSC) bezeichnet. Diese Streuung dient der

Beurteilung der Größe der Zelle. Ein anderer Anteil wird als Seitstrahllicht (*Side Scatter*, SSC) bezeichnet und im rechten Winkel zum eintreffenden Laserstrahl aufgefangen. Da diese Streuung insbesondere durch die Membranstruktur und die Granulation der Zelle beeinflusst wird, lässt sich hieraus die morphologische Struktur der Zelle bestimmen.

Da es nur wenige Zellen gibt, die natürlicherweise imstande sind, farbiges Licht zu emittieren, wird sich die Fluoreszenzaktivität verschiedener Farbstoffe zunutze gemacht. Diese Farbstoffe werden, konjugiert an monoklonale Antikörper, vor der Analyse auf die Zelloberfläche aufgebracht. Über ein System aus Spiegeln und Filtern werden die Emissionen zu Detektoren geleitet, die die Signale aufnehmen und zur weiteren Analyse an einen Computer weiterleiten.

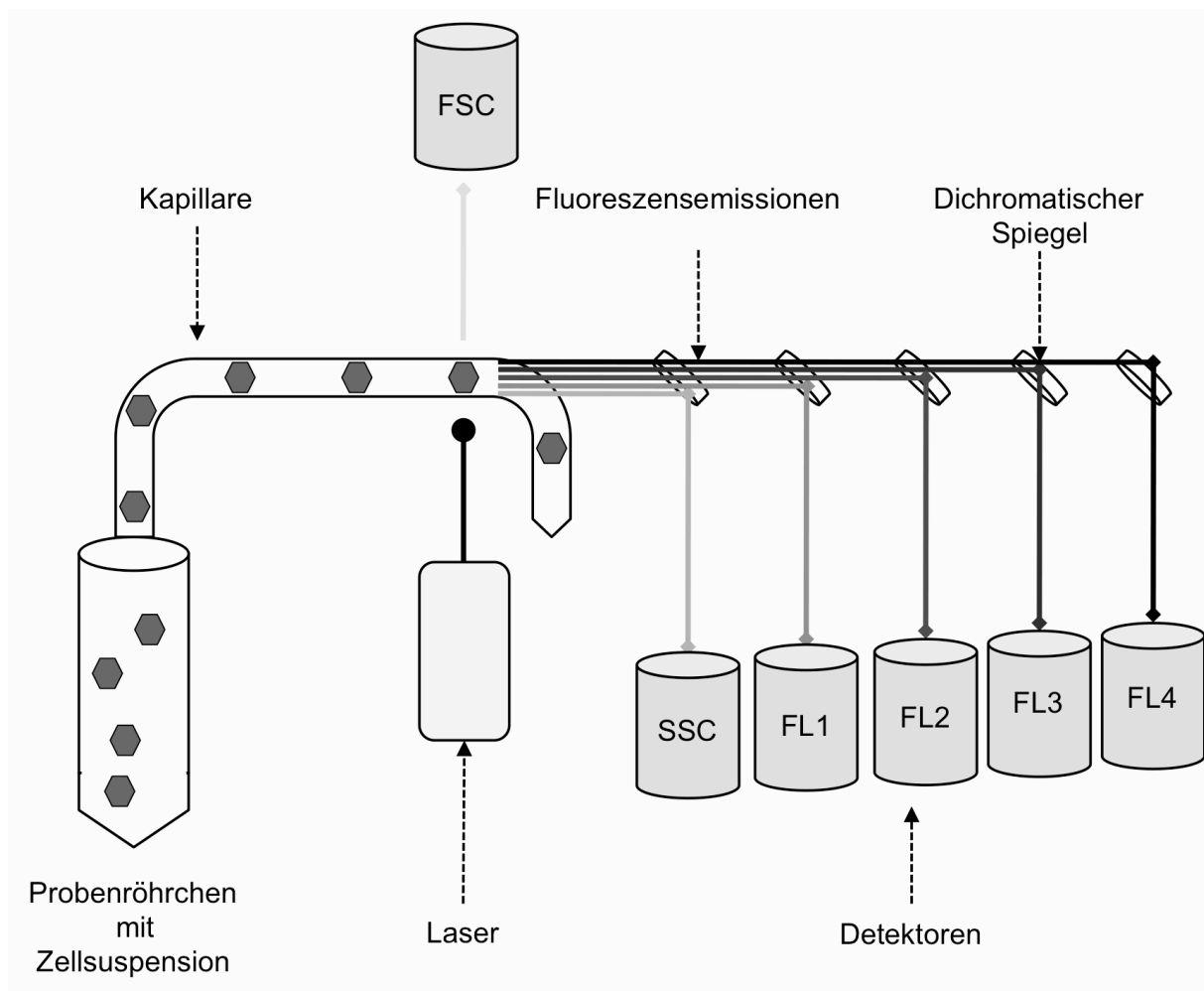


Abb.7: Schematische Darstellung des Funktionsprinzips der Durchflusszytometrie.

Die folgende Tabelle gibt einen Überblick über die monoklonalen Antikörper und die konjugierten Fluoreszenzfarbstoffe, die bei der FACS-Analyse verwendet wurden.

Farbstoff mit Emissionsmaximum	Verwendete Antikörper	Zugehöriger Isotyp	Hersteller
Fluorescein-Isothiocyanat (FITC) 520nm	CD4	Mouse IgG1	Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, Deutschland
	CD16	Mouse IgM	
	CD40	Mouse IgG1	BD Biosciences, San Jose, CA, USA
	CD80	Mouse IgG1	
	CD154	Mouse IgG1	
Phycoerythrin (PE) 580nm	CD3	Mouse IgG2a	BD Biosciences, San Jose, CA, USA
	CD86	Mouse IgG1	
	HLA-DR	Mouse IgG2a	
Peridinin-Chlorophyll / Cyanin (PerCP / Cy5.5) 677nm.	CD8	Mouse IgG1	eBiosciences, San Diego, CA, USA
	CD127	Mouse IgG1	
Allophycocyanin (APC) 660nm	CD14	Mouse IgG2a	Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, Deutschland
	CD25	Mouse IgG2b	
	CD28	Mouse IgG1	
	CD69	Mouse IgG1	

*Tab.3: Bei der Durchflusszytometrie trägt jeder monoklonale Antikörper einen Farbstoff, der aufgrund seiner spezifischen Lichtemission später zugeordnet werden kann. Die Tabelle gibt eine Übersicht über die verwendeten Antikörper und die daran gebundenen Farbstoffe. Zudem wird jeder Antikörper durch eine dafür spezielle Isotypkontrolle verifiziert.*

### 3.2.6.2 METHODIK

Die isolierten PBMCs wurden nun für die flowzytometrische Bestimmung ihrer Antigenexpression vorbereitet.

Zunächst wurde die Zellpopulation mit einem humanen Fc-Rezeptorblocker behandelt. Dazu wurden 10µl Antikörperlösung in 90µl FACS-Puffer gelöst, der Zellsuspension zugegeben und mittels Vortex vermischt. Anschließend wurden die Zellen bei 4°C für 10 Minuten inkubiert. Das Blocken dieses Rezeptors sollte eine

unspezifische Bindung später zugegebener Antikörper auf der Oberfläche von APCs verhindern.

Die Zellsuspension wurde dann durch Zugabe von *Hank's buffered salt solution* (HBSS) auf 250.000 Zellen/ml eingestellt. Je 1ml der Zellsuspension wurde auf entsprechende Polystyrolreagenzgefäße verteilt, mit je 3ml FACS-Puffer aufgefüllt und bei  $700 \times g$  für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde vollständig verworfen. Dieser Waschvorgang wurde noch ein weiteres Mal unter Verwendung von 4ml FACS-Puffer wiederholt.

Durch Zugabe von monoklonalen Antikörpern, konjugiert mit entsprechenden Fluoreszenzfarbstoffen, erfolgte die für die Flowzytometrie zentrale Färbung der Zellen (Übersicht siehe *Tab.3*). Dazu wurden die Zellen mit je 3µl der Farbstofflösung versetzt und für 30 Minuten bei 4°C in Dunkelheit inkubiert. Überschüssiger Farbstoff wurde durch einen weiteren Waschschrift entfernt. Nach einer weiteren Zugabe von 300µl FACS-Puffer waren die Zellen bereit zur Messung. Die Messung wurde unmittelbar im Anschluss an die Färbung durchgeführt.

### 3.2.6.3 MATERIAL

Gerät / Material	Herkunft / Firma
FACS-Puffer 1000ml PBS (selbst hergestellt) + 0,5% BSA + 0,02% $\text{NaN}_3$	Eigenproduktion
Fc-Rezeptorblocker	Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, Deutschland
Vortex / MS2 Minishaker	IKA-Werke, Staufen, Deutschland
HBSS	Lonza, Walkersville, MD, USA
FACS-Röhrchen (aus Polypropylen)	BD Falcon, Durham, NC, USA
FACS Calibur Flowcytometer	BD Biosciences, San Jose, CA, USA
Multipipette plus	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Spitzen für Multipipette	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Handpipetten (10µl, 100µl und 1000µl)	Gilson, Villiers-le-Bel, Frankreich
Sterile Pipettenspitzen (10µl, 100µl und 1000µl)	Gilson, Villiers-le-Bel, Frankreich



### 3.2.7 MULTI-PLEX-ASSAY

Zur Bestimmung der Zytokinkonzentrationen im Anschluss an die 24-stündige Zellkultur wurde ein *Multi-Plex-Assay* der Firma Biorad (*Bio-Plex-Assay*) verwendet. Dazu wurden je 50µl der asservierten und aliquotierten Zellkulturüberstände verwendet (56).

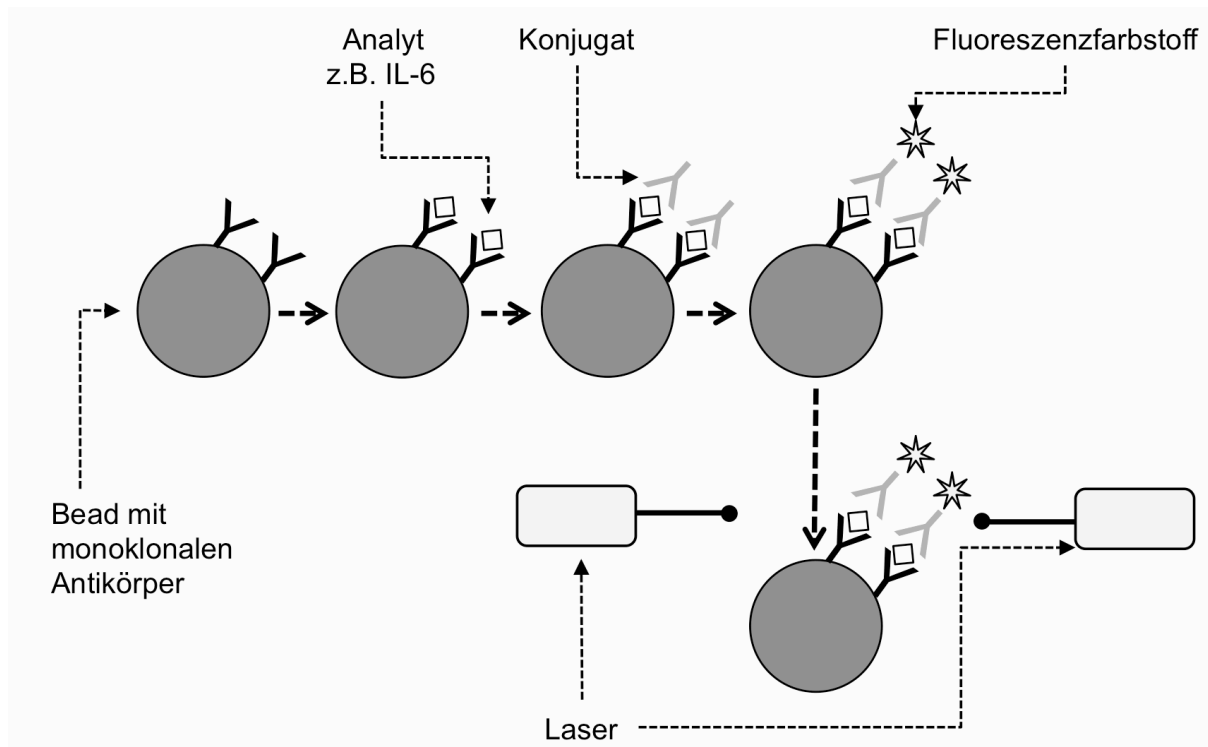
#### 3.2.7.1 PRINZIP

Der *Bio-Plex-Assay* ermöglicht die Bestimmung von mehreren verschiedenen Stoffen in einem Arbeitsschritt aus einer einzelnen Probe. Dabei werden mikroskopisch kleine Polystyrolsphären (*Beads*) mit einem Durchmesser von 5,6µm verwendet, die mit zwei unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen gefüllt sind. Die Klassifikation des Analyten erfolgt dann aus der kombinierten Fluoreszenz beider Farbstoffe im roten bzw. infraroten Lichtspektrum. Die Farbstoffe werden in jeweils zehn verschiedenen Konzentrationen in die Partikel eingebracht, woraus eine Gesamtzahl von 100 verschiedenen Analyten folgt. Die daraus resultierenden spektral unterscheidbaren Schattierungen werden als *Beadregions* bezeichnet. Jede *Beadregion* ist spezifisch für einen vorher definierten Analyten.

Auf der Oberfläche der *Beads* dienen monoklonale Antikörper, mittels ihrer hochspezifischen Affinität zur kovalenten Bindung des Analyten, der präzisen Zuordnung zur entsprechenden *Beadregion*.

Durch die Zugabe eines Detektionsmoleküls (Konjugat) werden die gebundenen Stoffe quantifiziert. Es handelt sich bei dem verwendeten Konjugat um spezifisch bindende Antikörper, an die ein weiterer Fluoreszenzfarbstoff (Streptavidin-Phycoerythrin) gekoppelt ist. Dieser Farbstoff emittiert im Wellenlängenbereich von grünem Licht, um eine Überschneidung der gemessenen Fluoreszenzen von *Beads* und Konjugat zu vermeiden.

Die Messung der Lichtemission erfolgt nach dem Prinzip der Durchflusszytometrie, das bereits im vorherigen Teil beschrieben wurde. Die Probe wird bei diesem Verfahren von zwei Festkörperlasern erfasst und die Fluoreszenzemission der Farbstoffe auf entsprechende Detektoren geleitet. Dort erfolgt die computergestützte Klassifikation (rote/infrarote Lichtemission der *Beads*) und Quantifizierung (grüne Lichtemission des Konjugats) des Analyten.



*Abb.8: Die farbstoffgefüllte Polystyrolsphäre (Bead) trägt einen monoklonalen Antikörper auf der Oberfläche, an den der zu analysierende Stoff bindet. Über einen weiteren Antikörper wird dann ein weiterer Farbstoff gebunden. Im Anschluss erfolgt die Auswertung durch zwei Laser verschiedener Wellenlänge.*

### 3.2.7.2 METHODIK

Zu Beginn des Assays wurden die aliquotierten Proben (Zellüberstände) aufgetaut und mit Zellkulturmedium zu einer Konzentration von 1:10 verdünnt. Dieser Arbeitsschritt und die anschließende Lagerung bis zur Weiterverarbeitung wurden stets auf Eis durchgeführt.

In einem weiteren Schritt wurde der für die Messung verwendete Standard nach Angaben des Herstellers in einer Verdünnungsreihe vorbereitet. Dazu wurde der gefriergetrocknete Standard in 500µl Zellkulturmedium (RPMI 1640) aufgelöst und 30 Minuten auf Eis inkubiert. Dann wurden 128µl der so entstandenen Vorratslösung mit weiteren 72µl Zellkulturmedium in einem Reagenzgefäß vermischt. Es folgte eine sukzessive Verdünnungsreihe mit acht absteigenden Verdünnungen, bei der jeweils 50µl des verdünnten Standards in 150µl Zellkulturmedium überführt wurden.

Die Stocklösung mit den *Beads* wurde ebenfalls nach einem vorgegebenen Schema mittels *Assay-Buffer* hergestellt und je 50µl pro Well auf die 96-Well-Zellkulturplatte aufgebracht.

Nach einem ersten Waschschrift mit zweimalig 100µl/Well *Wash-Buffer* wurden dann nach einem festen Schema je 50µl des Standards und der verdünnten Proben in die Zellkulturplatte pipettiert und für 30 Minuten auf einem Schüttler bei 300rpm in Dunkelheit inkubiert.

Währenddessen wurden die Detektionsantikörper (*Anti Cytokine Conjugated Beads*) für die zu bestimmenden Zytokine in einem vorgeschriebenen Verhältnis mit dem *Detection-Antibody-Diluent* verdünnt. Nach Ablauf der 30 Minuten wusch man die Zellkulturplatte dreimal mit 100µl/Well *Wash-Buffer*, gab 25µl/Well der *Detection-Antibody*-Lösung in die Wells und inkubierte diese nach Abdeckung erneut für 30 Minuten auf dem Schüttler.

Im zeitlichen Intervall konnte der Streptavidin-Antikörper im vorgeschriebenem Verhältnis mit dem *Assay-Buffer* verdünnt werden. Vor dem Aufbringen des Streptavidinantikörpers (50µl/well) wurde die Zellkulturplatte noch zweimal gewaschen und dann für weitere zehn Minuten inkubiert.

Schließlich diluierte man die Lösungen in den Wells mit je 100µl *Assay-Buffer*, und die Platte war damit bereit für die computergestützte Auswertung im Bio-Plex-Messgerät.

### 3.2.7.3 MATERIAL

Gerät / Material	Herkunft / Firma
Mikrotitrierplatte (96 Wells) inkl. Abdeckung und Ablagewanne	BioRad Laboratories, Hercules, CA; USA
Bio-Plex Assay Buffer	BioRad Laboratories, Hercules, CA; USA
Bio-Plex Wash Buffer	BioRad Laboratories, Hercules, CA; USA
Bio-Plex Detection Antibody Diluent	BioRad Laboratories, Hercules, CA; USA
Streptavidin-PE	BioRad Laboratories, Hercules, CA; USA
<i>Anti Cytokine Conjugated Beads</i> spezifisch für IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-6, IL-10, IFN- $\gamma$ , GM-CSF und TNF- $\alpha$	BioRad Laboratories, Hercules, CA; USA
Bio-Plex Array Reader	BioRad Laboratories, Hercules, CA; USA
Schüttler KS 130 basic	IKA-Werke, Staufen, Deutschland
Sterile Pipettenspitzen	Gilson, Villiers-le-Bel, Frankreich
Pipetten 1000µl/200µl/20µl	Gilson, Villiers-le-Bel, Frankreich

### 3.3 STATISTIK

Die Darstellung der Messwerte erfolgte als Median mit Interquartilsabständen. Um eine bessere Vergleichbarkeit unterschiedlicher Parameter zu erreichen, wurden die Messwerte auf den präoperativ gemessenen Ausgangswert normalisiert und anschließend nur die relativen Veränderungen bezogen auf diesen Ausgangswert dargestellt.

Als präoperativer Vergleichswert für die veränderte Zytokinsekretion bei septischen Patienten diente der mediane präoperative Wert der elf hier untersuchten operativen Patienten.

Für die Expression der ermittelten Oberflächenmarker galt ebenso jeweils der präoperativ ermittelte Wert als Ausgangswert, anhand dessen die relative Veränderung der Proteinexpression ermittelt wurde.

Analog diente bei der Beurteilung der Werte von septischen Patienten der mediane präoperative Wert aller elf operierten Patienten als Referenz.

Die statistische Analyse erfolgte unter Verwendung von SigmaPlot 10 (Systat Software Inc., San Jose, CA, USA). In Abhängigkeit der einzelnen untersuchten Parameter kamen dabei verschiedene statistische Tests zur Untersuchung eines bestehenden Signifikanzniveaus zum Einsatz. Der *Wilcoxon Signed Rank Test* diente dabei als standardisierter Test für alle ermittelten Messwerte. Zudem fanden der *Mann Whitney Rank Sum Test* und ein *Paired t-Test* für einzelne Messungen zur veränderten Zytokinsekretion prä- und postoperativer Messwerte Anwendung. Für alle statistischen Untersuchungen wurde ein Signifikanzniveau von  $p < 0,05$  angenommen.

## 4 ERGEBNISSE

### 4.1 ZELLSPEZIFISCHE OBERFLÄCHENMARKER

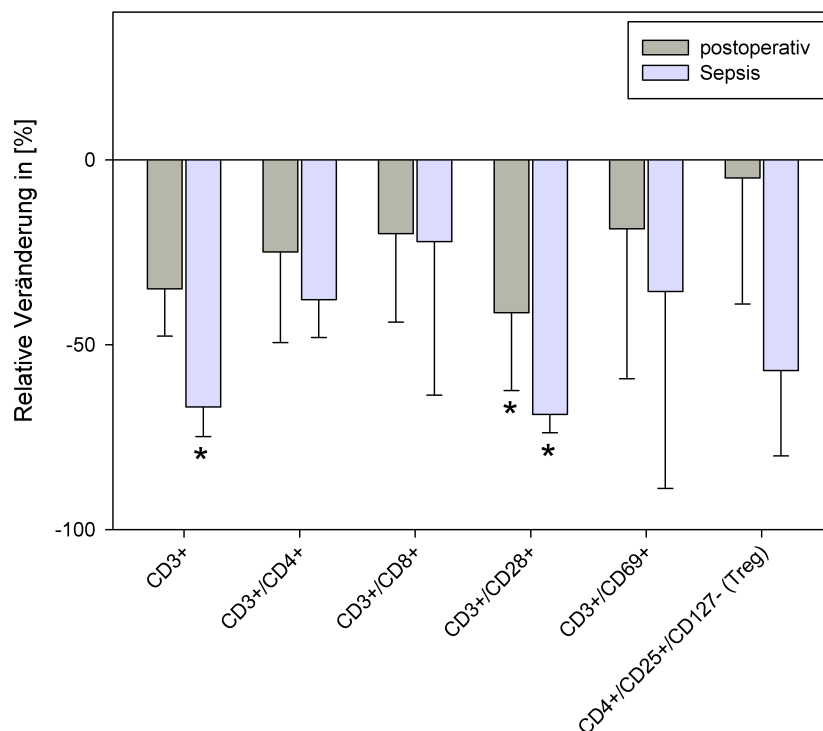
Die Messung der Expression zellspezifischer Oberflächenmarker mittels FACS-Analyse erfolgte zwei Stunden postoperativ sowie im septischen Krankheitszustand einzelner Patienten.

#### 4.1.1 EXPRESSION T-ZELL SPEZIFISCHER OBERFLÄCHENANTIGENE

Postoperativ ergab sich für alle untersuchten Oberflächenmarker eine Verringerung der Expression zwei Stunden nach Beendigung des Eingriffs. Ein signifikanter ( $p < 0,05$ ) Abfall dieser Expression ergab sich hierbei für CD3 und für CD28.

Im direkten Vergleich dazu ergab die Ermittlung der Oberflächenmarker im septischen Krankheitszustand ein vergleichbar homogenes Bild. Hier konnte für die Expression von CD28 ebenfalls ein signifikantes Zurückgehen gezeigt werden.

Die isolierte Betrachtung regulatorischer T-Zellen ( $T_{reg}$ ), die sich durch die Expression von CD4, CD25 und CD127 spezifizieren lassen, ergab ein vermindertes Vorhandensein dieser Zellen. Im Vergleich mit präoperativ ermittelten Werten konnte allerdings keine signifikante Veränderung ermittelt werden.



**Abb.9:** Grafische Darstellung der T-Zell spezifischen Oberflächenmarker zwei Stunden nach OP und bei Sepsis.

Darstellung als relative Veränderung zu präoperativ ermittelten Werten in [%]. N=11 (postoperativ), N=6 (Sepsis); \* $p < 0,05$  gegen präoperativ

#### 4.1.2 EXPRESSION APC-SPEZIFISCHER OBERFLÄCHENANTIGENE

Die Bestimmung der APC-spezifischen Oberflächenmarker ergab für den postoperativen Verlauf einen Anstieg der Expression für alle untersuchten Marker. Ein signifikanter Anstieg ( $p < 0,05$ ) im Vergleich mit präoperativen Werten konnte hierbei für CD14 (LPS-Rezeptor), CD86 (Co-Stimulator der T-Zellaktivierung) sowie HLA-DR nachgewiesen werden, das die zentrale Rolle bei der Antigenpräsentation spielt.

Bei der Messung der Oberflächenantigene bei Sepsis ergab sich ein heterogenes Bild mit einer Verringerung der Ausbildung von CD80 und HLA-DR. Zudem konnte bei der Bestimmung dieser Parameter lediglich ein Tendenz, aber keine signifikante Veränderung der Expression aller untersuchter Oberflächenmarker gezeigt werden.

Myeloide Suppressorzellen (*Myeloid Derived Suppressor Cells*, MDSC), die durch eine fehlende Expression von HLA-DR charakterisiert sind, wurden sowohl postoperativ als auch bei Sepsis vermehrt gemessen, ohne dass sie dabei im signifikanten Maße im Vergleich zu präoperativen Werten vorlagen.

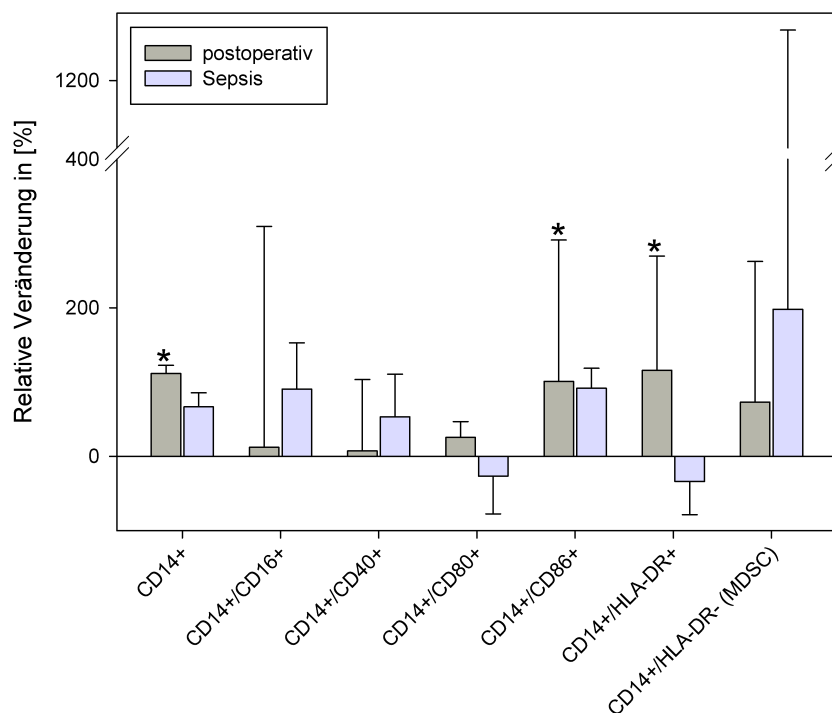


Abb.10: Grafische Darstellung der APC-spezifischen Oberflächenmarker zwei Stunden nach OP und bei Sepsis.

Darstellung als relative Veränderung zu präoperativ ermittelten Werten in [%]. N=11 (postoperativ), N=6 (Sepsis); \* $p < 0,05$  gegen präoperativ

## 4.2 ZYTOKINE

Ein Parameter bei der Beurteilung der Zellfunktion nach abdominalchirurgischen Eingriffen, stellte die Bestimmung von pro- und antiinflammatorischen Zytokinen dar, die von den Zellen der Cokultur sezerniert wurden.

### 4.2.1 SEKRETION T-ZELL SPEZIFISCHER ZYTOKINE ZUR BEURTEILUNG DER APC-FUNKTION

Die angewandte Methodik erlaubt die Charakterisierung des Effekts abdominalchirurgischer Eingriffe auf die Funktion von APCs. Durch die Bestimmung der Zytokinsekretion nativer T-Zellen nach der Interaktion mit nativen APCs und mit APCs operierter Patienten, kann ein modulatorischer Effekt der Interaktion nachgewiesen werden. Die Darstellung erfolgt stets im relativen Vergleich zu Werten, die aus Cokulturen von präoperativ isolierten nativen APCs und nativen T-Zellen ermittelt wurden.

	<b>T-Zelle Patient, nativ + APCs Patient, nativ</b>	<b>T-Zelle Kontrolle, nativ + APCs Patient, nativ</b>	<b>T-Zelle Leukämie, nativ + APCs Patient, nativ</b>
IL-2	111,8 (0,7-1.285,3)	57,2 (0,7-587,4)	0,7 (0,7-21,1)
IL-10	2.698,6 (587,7-9.114,8)	2.900,5 (692,3-8.932,2)	3.150,9 (1.772,6-7.981,8)
IFN- $\gamma$	4.406,7 (558,0-47.942,2)	7.636,1 (3.341,8-31.561,6)	119,6 (60,6-2.808,0)

*Tab.4: Übersicht über die gemessenen Zytokinkonzentrationen (Median in pg/ml) nach 24 Stunden Cokultur mit nativen APCs der chirurgischen Patienten und nativen T-Zellen unterschiedlicher Herkunft. In Klammern ist der Interquartilsabstand angegeben. Die Stimulation erfolgte mit LPS. Diese Werte wurden als Referenzwerte verwendet.*



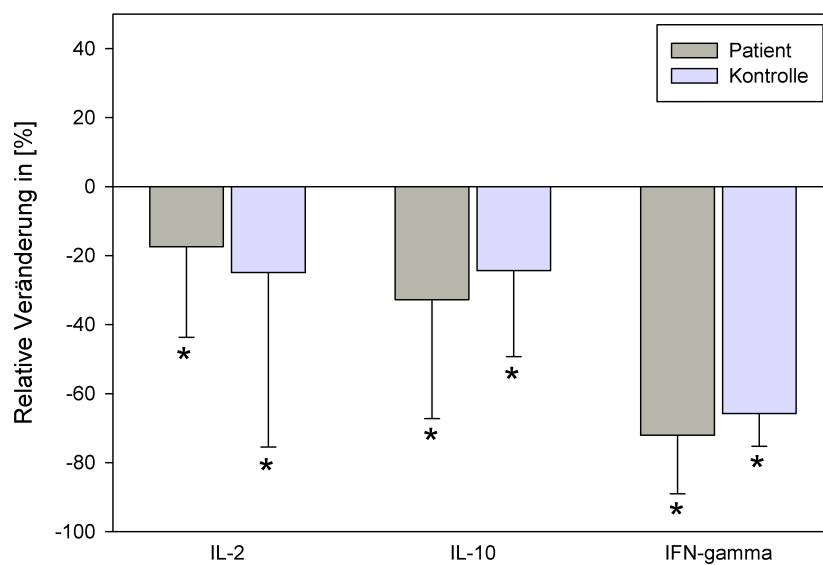
## 4.2.1.1 POSTOPERATIVE SEKRETION T-ZELL SPEZIFISCHER ZYTOKINE

	<b>T-Zelle Patient, nativ + APCs Patient, post-OP</b>	<b>T-Zelle Kontrolle, nativ + APCs Patient, post-OP</b>	<b>T-Zelle Leukämie, nativ + APCs Patient, post-OP</b>
IL-2	71,7 (0,7-830,5)	19,9 (0,7-583,5)	0,7 (0,7-10,5)
IL-10	1.267,6 (574,9-3.591,8)	1.529,5 (692,3-8.932,2)	1.864,9 (662,3-4.250,2)
IFN- $\gamma$	1.547,7 (60,0-6.174,8)	3.530,4 (60,0-12.477,6)	59,9 (60,0-1.750,1)

*Tab.5: Übersicht über die gemessenen Zytokinkonzentrationen (Median in pg/ml) nach 24 Stunden Cokultur mit postoperativen APCs der chirurgischen Patienten und nativen T-Zellen unterschiedlicher Herkunft. In Klammern ist der Interquartilsabstand angegeben. Die Stimulation erfolgte mit LPS.*

Postoperativ ergab sich für die Sekretion der T-Zellspezifischen Zytokine eine Verminderung der Ausschüttung der proinflammatorischen Zytokine IL-2 und IFN- $\gamma$  und des antiinflammatorischen Zytokins IL-10, wobei die Verminderung der Sekretion aller gemessener Parameter eine signifikante Reduktion ( $p < 0,05$ ) im Vergleich zu Werten darstellt, die in der Cokultur aus präoperativ gewonnenen nativen APCs mit nativen T-Zellen gemessen wurden. Alle Cokulturen wurden mit LPS stimuliert.

Bestätigt werden konnte dieses Ergebnis durch die verminderte Zytokinsekretion der nativen Kontroll-T-Zellen des gesunden Spenders, die ebenfalls für alle drei bestimmten Mediatoren einen signifikanten ( $p < 0,05$ ) Rückgang der Sekretion erbrachten.

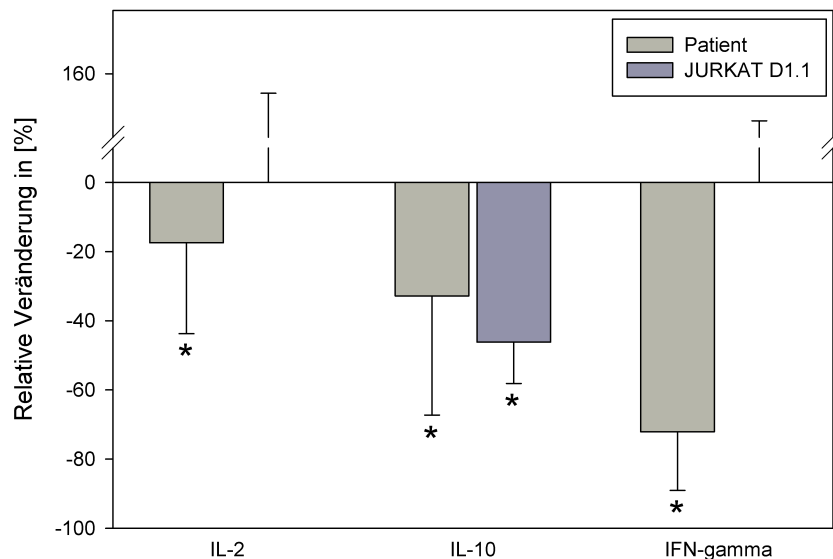


**Abb.11: Relative Veränderung in [%] der Zytokinsekretion nativer T-Zellen nach Cokultur mit APCs operierter Patienten.**

Die nativen T-Zellen waren dabei aus dem Blut der chirurgischen Patienten (grau) isoliert worden bzw. aus dem Blut des gesunden Kontrollpatienten (blau).

N=11, \* $p < 0,05$  gegen präoperativ

Bei der Kontrolle der Ergebnisse durch die Verwendung von Leukämiezelllinien als Kontrolle ergab sich mit einem signifikantem Rückgang lediglich für die Sekretion von IL-10 eine Bestätigung der verminderten Zytokinausschüttung. Für die Beurteilung der Sekretion von IL-2 und IFN- $\gamma$  konnte in dieser Studie keine aussagekräftigen Ergebnisse generiert werden.



**Abb.12: Relative Veränderung in [%] der Zytokinsekretion nativer T-Zellen nach Kokultur mit APCs operierter Patienten.**

Die nativen T-Zellen waren dabei aus dem Blut der chirurgischen Patienten (grau) isoliert worden bzw. aus der Leukämiezelllinie JURKAT D1.1 (graublau) entnommen.

N=11, \* $p < 0,05$  gegen präoperativ

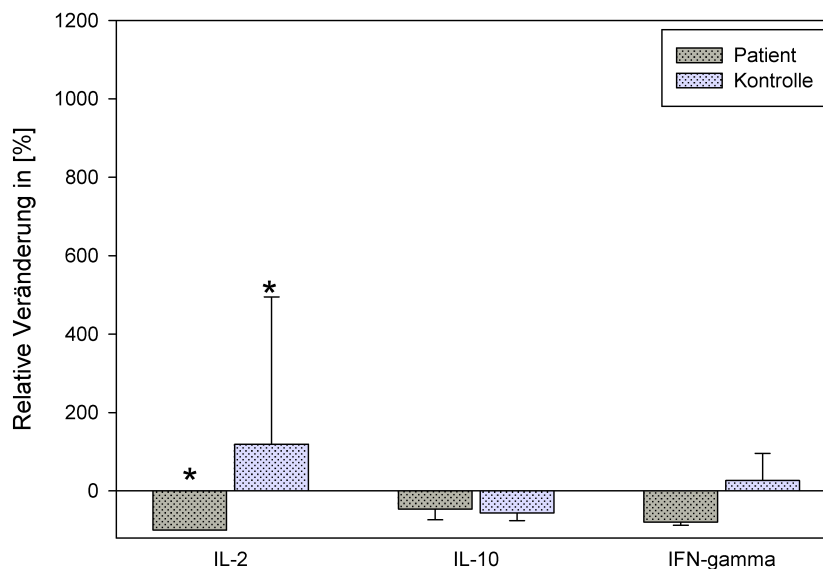
## 4.2.1.2 SEKRETION T-ZELL SPEZIFISCHER ZYTOKINE BEI SEPSIS

	<b>T-Zelle Patient, nativ + APCs Patient, septisch</b>	<b>T-Zelle Kontrolle, nativ + APCs Patient, septisch</b>	<b>T-Zelle Leukämie, nativ + APCs Patient, septisch</b>
IL-2	0,7 (0,7-3,0)	303,6 (79,6-955,1)	417,4 (56,7-1.297,1)
IL-10	1.769,7 (545,8-4.961,4)	1.509,8 (458,5-4.480,6)	1.820,3 (751,0-6.833,8)
IFN-γ	2.225,6 (1.096,1-8.159,1)	12.205,2 (4.990,7-34.049,8)	2.225,6 (1.096,1-8.160,1)

*Tab.6: Übersicht über die gemessenen Zytokinkonzentrationen (Median in pg/ml) nach 24 Stunden Cokultur mit septischen APCs der chirurgischen Patienten und nativen T-Zellen unterschiedlicher Herkunft. In Klammern ist der Interquartilsabstand angegeben. Die Stimulation erfolgte mit LPS.*

Bei der Bestimmung der Zytokinsekretion nativer T-Zellen nach der Coinkubation mit APCs septischer Patienten ergab sich für alle bestimmten Parameter (IL-2, IL-10, IFN- $\gamma$ ) eine relative Verminderung der Zytokinsekretion im Vergleich zu den Werten, die bei Cokulturen mit nativen APCs ermittelt wurden. Dabei konnte für die Ausschüttung von IL-2 sogar eine signifikante Verminderung beobachtet werden.

Bei Betrachtung der Zytokinsekretion der nativen Kontrollzellen konnte hingegen nur eine Verminderung der Produktion von IL-10 gezeigt werden, die einen Rückgang der Sekretion dieses Zytokins im Versuchsaufbau bestätigt. Im Falle von IL-2 und IFN- $\gamma$  ergab die Bestimmung in diesen Zellkulturen sogar einen zum Teil sehr hohen Anstieg der Sekretion, die für IL-2, entgegen des Ergebnisses mit nativen Patientenzellen, sogar signifikant war.

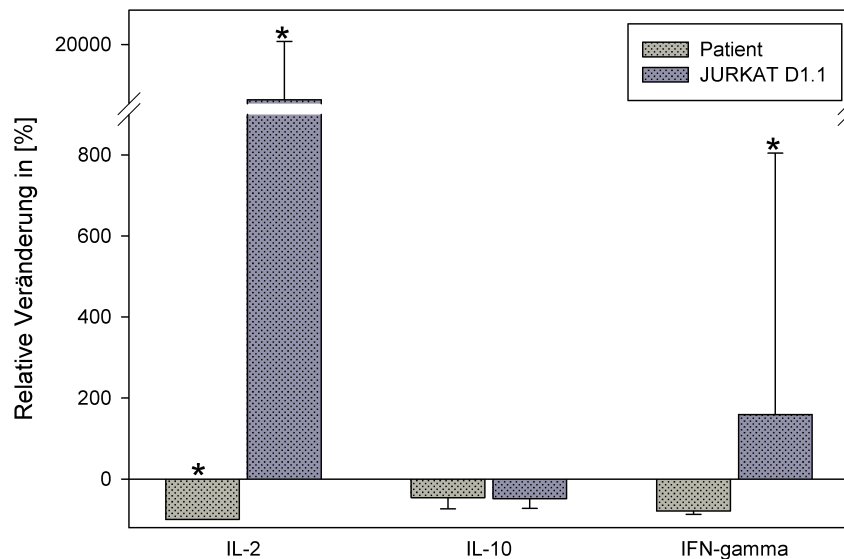


**Abb.13:** Relative Veränderung in [%] der Zytokinsekretion nativer T-Zellen nach Cokultur mit septischen APCs.

Die nativen T-Zellen waren dabei aus dem Blut der chirurgischen Patienten (grau) isoliert worden bzw. aus dem Blut des gesunden Kontrollpatienten (blau).

N=6, \* $p < 0,05$  gegen präoperativ

Bei der Sekretion der Zytokine nach Cokultur mit den Leukämiezelllinien zeigt sich ein analoges Bild zum oben gezeigten Ergebnis mit einer Bestätigung der Verminderung von IL-10 bei Sepsis und einem gegenläufigen, deutlichen Anstieg von IL-2 und IFN- $\gamma$  im Vergleich zu den patienteneigenen Zellen. Zudem wurde gezeigt, dass sowohl der Anstieg von IL-2 als auch der Anstieg von IFN- $\gamma$  signifikant erhöht waren.



**Abb.14:** Relative Veränderung in [%] der Zytokinsekretion nativer T-Zellen nach Cokultur mit septischen APCs.

Die nativen T-Zellen waren dabei aus dem Blut der chirurgischen Patienten (grau) isoliert worden bzw. aus der Leukämiezelllinie JURKAT D1.1 (graublau) entnommen.

N=6, \* $p < 0,05$  gegen präoperativ

#### 4.2.2 SEKRETION MONOZYTEN-SPEZIFISCHER ZYTOKINE ZUR BEURTEILUNG DER T-ZELLFUNKTION

Für den Nachweis einer veränderten T-Zellfunktion nach abdominalchirurgischen Eingriffen wurden analog zur Bestimmung der APC-Funktion, die ausgeschütteten spezifischen Zytokine der kommunizierenden Zelle nach Cokultur bestimmt. Die angezeigten Werte sind relative Veränderungen zu Zytokinwerten, die aus Cokulturen mit präoperativen T-Zellen und den gleichen nativen APCs gewonnen wurden.

	<b>APCs Patient, nativ + T-Zelle Patient, nativ</b>	<b>APCs Kontrolle, nativ + T-Zelle Patient, nativ</b>	<b>APCs Leukämie, nativ + T-Zelle Patient, nativ</b>
IL-1 $\beta$	504,9 (4,7-3.305,4)	832,6 (395,8-2.241,6)	2.627,3 (1.619,6-3.166,1)
IL-6	5.604,3 (82,3-38.985,5)	3.849,7 (281,3-26.976,6)	2.217,0 (1.048,4-3.876,1)
IL-10	47,5 (11,6-451,2)	22,9 (10,9-187,4)	1.620,7 (993,5-17.591,7)
TNF- $\alpha$	9.518,0 (609,4-23.334,0)	7.189,6 (1.230,1-16.091,3)	8.078,6 (4.047,5-11.625,7)
GM-CSF	138,3 (78,3-792,6)	108,9 (48,2-292,7)	184,9 (128,2-1.254,9)

*Tab.7: Übersicht über die gemessenen Zytokinkonzentrationen (Median in pg/ml) nach 24 Stunden Cokultur mit nativen T-Zellen der chirurgischen Patienten und nativen APCs unterschiedlicher Herkunft. In Klammern ist der Interquartilsabstand angegeben. Die Stimulation erfolgte mit antiCD3 und antiCD28. Diese Werte wurden als Referenzwerte verwendet.*

## 4.2.2.1 POSTOPERATIVE SEKRETION APC-SPEZIFISCHER ZYTOKINE

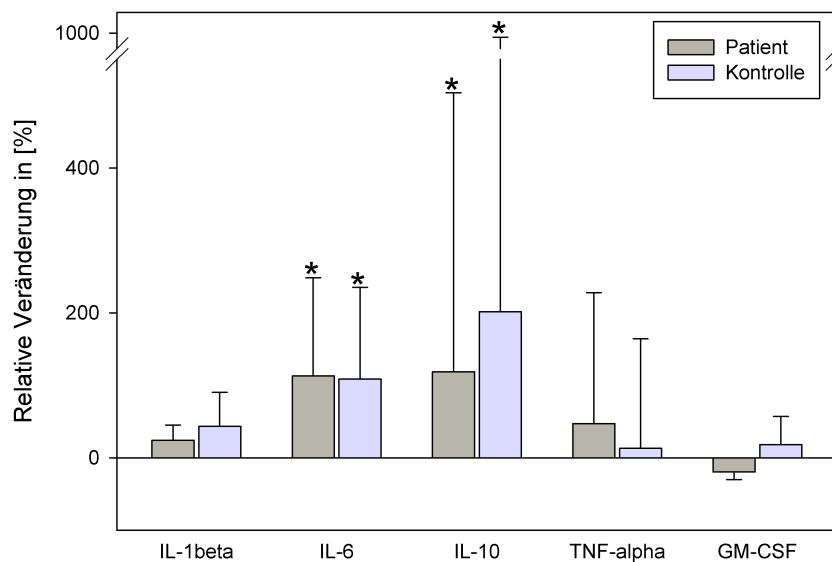
	<b>APCs Patient, nativ + T-Zelle Patient, geschockt</b>	<b>APCs Kontrolle, nativ + T-Zelle Patient, geschockt</b>	<b>APCs Leukämie, nativ + T-Zelle „Patient, geschockt“</b>
IL-1 $\beta$	729,4 (37,1-1.728,7)	935,6 (313,0-2.930,5)	2.073,5 (1.364,2-3.424,9)
IL-6	11.199,2 (1.089,3-26.708,9)	10.630,1 (2.955,8-30.455,5)	2.007,5 (490,9-14.662,2)
IL-10	162,3 (10,8-985,8)	198,0 (12,8-290,0)	1.389,6 (538,0-17.217,9)
TNF- $\alpha$	15.175,3 (2.457,2-41.182,4)	7.371,5 (1.391,1-18.517,6)	5.947,7 (2.878,8-11.489,0)
GM-CSF	149,5 (31,5-1.030,8)	144,4 (63,8-347,9)	165,8 (78,3-1.134,8)

*Tab.8: Übersicht über die gemessenen Zytokinkonzentrationen (Median in pg/ml) nach 24 Stunden Kokultur mit T-Zellen operierter Patienten und nativen APCs unterschiedlicher Herkunft. In Klammern ist der Interquartilsabstand angegeben. Die Stimulation erfolgte mit antiCD3 und antiCD28.*



Mit Ausnahme der bestimmten GM-CSF Konzentration ergab die Messung der von patienteneigenen Zellen ausgeschütteten Zytokine für alle ermittelten Werte einen Anstieg der sezernierten Mengen nach spezifischer Stimulation der T-Zellen durch antiCD3 und antiCD28. Für IL-6 und IL-10 wurde dabei ein signifikanter Anstieg ( $p < 0,05$ ) ermittelt.

Bestätigt werden konnten diese Werte durch die Cokultur mit gesunden nativen Kontroll-APCs, die ebenfalls einen signifikanten ( $p < 0,05$ ) Anstieg für IL-6 und IL-10 ergaben. Einen Unterschied ergab hierbei die Bestimmung von GM-CSF, die im Gegensatz zu der Cokultur mit APCs der operativen Patienten eine leichte Erhöhung der Konzentration erbrachte.

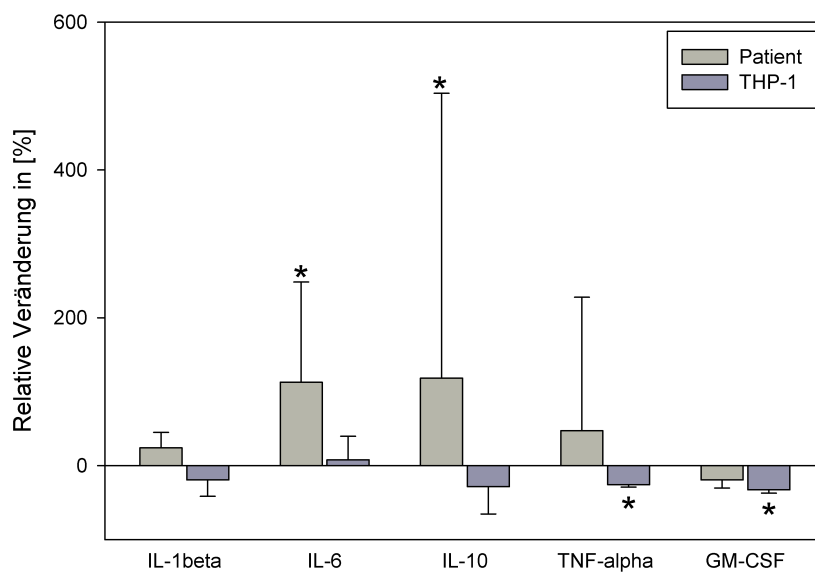


**Abb.15:** Relative Veränderung in [%] der Zytokinsekretion nativer APCs nach Cokultur mit T-Zellen operierter Patienten.

Die nativen APCs waren dabei aus dem Blut der chirurgischen Patienten (grau) isoliert worden bzw. aus dem Blut des gesunden Kontrollpatienten (blau).

N=11, \* $p < 0,05$  gegen präoperativ

Bei der Kontrolle der Ergebnisse durch die Verwendung der APC-Leukämiezellreihe THP-1 ergab sich ein nahezu umgekehrtes Bild zu den Ergebnissen. Es konnte für lediglich eines der bestimmten Zytokine eine Bestätigung für den Anstieg der Konzentration gezeigt werden (IL-6). Hingegen konnte der Abfall der GM-CSF Konzentration durch die Cokultur mit Leukämiezelllinien bestätigt werden. Ebendiese Verminderung als auch die Verminderung der TNF- $\alpha$ -Konzentration wurden dabei als signifikant zum Vergleichswert ermittelt.



**Abb.16:** Relative Veränderung in [%] der Zytokinsekretion nativer APCs nach Cokultur mit T-Zellen operierter Patienten.

Die nativen APCs waren dabei aus dem Blut der chirurgischen Patienten (grau) isoliert worden bzw. aus der Leukämiezelllinie THP-1 (graublau) entnommen worden.

N=11, \* $p < 0,05$  gegen präoperativ

## 4.2.2.2 SEKRETION APC-SPEZIFISCHER ZYTOKINE BEI SEPSIS

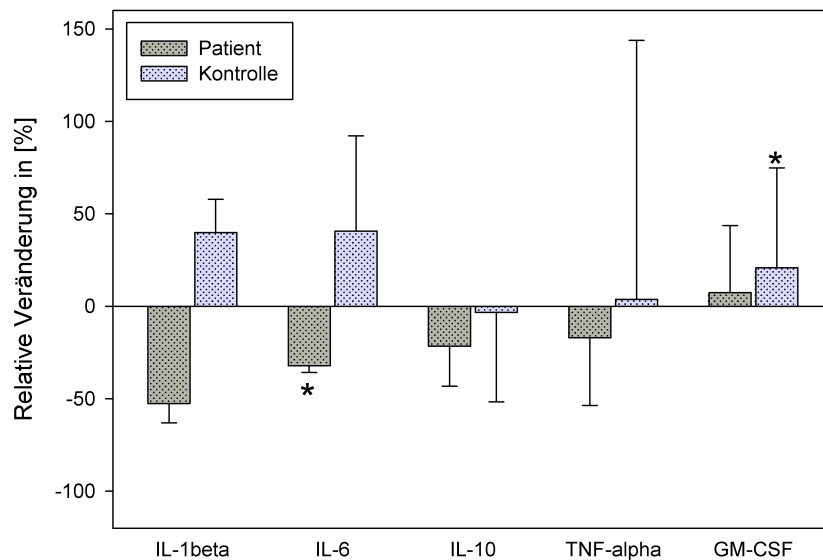
	<b>APCs Patient, nativ + T-Zelle Patient, septisch</b>	<b>APCs Kontrolle, nativ + T-Zelle Patient, septisch</b>	<b>APCs Leukämie, nativ + T-Zelle Patient, septisch</b>
IL-1 $\beta$	498,9 (389,4-1.815,2)	1.348,2 (606,0-1.521,0)	36,6 (9,8-1.155,5)
IL-6	6.389,1 (6.014,3-16.786,6)	9.491,4 (2.853,9-16.710,3)	1.795,2 (254,1-15.557,9)
IL-10	84,5 (25,0-134,5)	50,9 (20,6-335,9)	607,2 (41,8-3.334,4)
TNF- $\alpha$	8.781,9 (1.350,5-12.408,6)	6.627,2 (2.003,4-21.553,5)	3.975,3 (288,0-18.336,0)
GM-CSF	197,3 (81,9-385,3)	169,7 (148,9-324,6)	268,7 (147,2-467,3)

*Tab.9: Übersicht über die gemessenen Zytokinkonzentrationen (Median in pg/ml) nach 24 Stunden Kokultur mit septischen T-Zellen der chirurgischen Patienten und nativen APCs unterschiedlicher Herkunft. In Klammern ist der Interquartilsabstand angegeben. Die Stimulation erfolgte mit antiCD3 und antiCD28.*

Bei der Cokultur nativer APCs mit T-Zellen septischer Patienten, zeigt sich für die proinflammatorischen Zytokine IL-1 $\beta$ , IL-6 und TNF- $\alpha$  ein anderes Bild. Während die Cokultur mit Zellen des septischen Patienten eine Verminderung anzeigen (für IL-6 sogar signifikant), zeigt die Cokultur mit gesunden Kontrollzellen hingegen einen Anstieg an.

GM-CSF, ein Mobilisator der Granulozyten- und Makrophagenpopulation, steigt in beiden Cokulturen relativ zum Vergleichswert an. Im Falle der gesunden Kontrollzellen ist der Anstieg signifikant.

Nur für das antiinflammatorische Zytokin IL-10 kann aus beiden Kulturen eine gleiche Tendenz zu sinkenden Konzentrationen abgelesen werden.

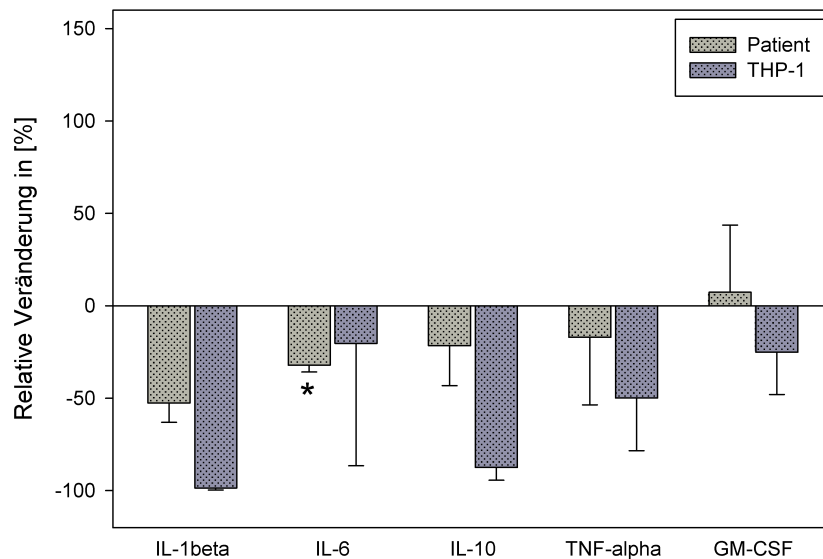


**Abb.17:** Relative Veränderung in [%] der Zytokinsekretion nativer APCs nach Cokultur mit septischen T-Zellen.

Die nativen APCs waren dabei aus dem Blut der chirurgischen Patienten (grau) isoliert worden bzw. aus dem Blut des gesunden Kontrollpatienten (blau).

N=6, \* $p < 0,05$  gegen präoperativ

Die Kontrolle der Ergebnisse durch die Verwendung von Leukämiezelllinien erbrachte, im Gegensatz zu den zuvor dargestellten Ergebnissen aus Cokulturen mit T-Zellen septischer Patienten, eine weitgehende Bestätigung der verminderten Zytokinsekretion durch APCs nach Interaktion mit T-Zellen. Mit Ausnahme der verminderten Sekretion von GM-CSF konnte die verminderte Sekretion der Mediatoren, wenn auch nicht signifikant, so dennoch tendenziell bestätigt werden.



**Abb.18:** Relative Veränderung in [%] der Zytokinsekretion nativer APCs nach Cokultur mit septischen T-Zellen.

Die nativen APCs waren dabei aus dem Blut der chirurgischen Patienten (grau) isoliert worden bzw. aus der Leukämiezelllinie THP-1 (graublau) entnommen.

N=6, \* $p < 0,05$  gegen präoperativ

## 5 DISKUSSION

### 5.1 FRAGESTELLUNG

Nach chirurgischem Trauma und hämorrhagischem Schock entwickelt sich regelmäßig eine Dysfunktion des Immunsystems, die in zahlreichen tierexperimentellen und klinischen Studien nachgewiesen werden konnte (8,15,57). Auch nach großen abdominalchirurgischen Eingriffen wurde eine postoperative Immunsuppression in ähnlicher Weise beschrieben (12–14). Deren zelluläre Mechanismen bleiben jedoch weitgehend unverstanden (16,58–61).

Bisherige Studien fokussierten sich weitgehend auf den direkten Effekt von Trauma und Schock auf die beteiligten Zellpopulationen (16,20,22,62). Ebenso wurde der Einfluss von Sexualhormonen auf das Immunsystem in Folge operativer Eingriffe am Mausmodell und mit humanen Zellen *in vitro* untersucht (63–71).

Dabei weitgehend außer Acht gelassen wurde der Effekt von Trauma und Blutverlust bzw. des chirurgischen Eingriffes auf die Funktion einzelner beteiligter Zellpopulationen mit Blick auf eine zellvermittelte Störung der Immunfunktion durch Interaktion von veränderten antigenpräsentierenden Zellen und T-Zellen (72).

Neuere tierexperimentelle Studien postulieren dabei eine von T-Zellen ausgehende Funktionsstörung nach Trauma und Schock. Walz *et al.* wiesen eine verminderte Sekretion von IL-4 und IFN- $\gamma$  als Th1-spezifische Zytokine sowie GM-CSF als Th2-spezifisches Zytokin nach. Dazu wurden Kokulturen angelegt, in denen APCs mit T-Zellen im jeweils geschockten und nativen Zustand inkubiert wurden. Dabei konnte ein supprimierender Effekt nach Trauma und hämorrhagischen Schock durch Makrophagen nicht nachgewiesen werden. Vielmehr scheint eine Vermittlung des Defekts durch die kommunizierenden T-Zellen wahrscheinlich, wobei eine klare Differenzierung zwischen Th1- und Th2-Zellen ausblieb. (49,73).

Eine differenzierte Beurteilung der gestörten Interaktion zwischen T-Zellen und APCs fand mit humanen Immunzellen bisher nicht statt. Das Ziel dieser Studie bestand somit darin, eine isolierte Betrachtung der veränderten Zellfunktion von APCs und T-Zellen vorzunehmen. Dabei wurde die Frage in den Mittelpunkt gestellt, ob Störungen, die durch abdominalchirurgische Eingriffe an einer der beiden Zellpopulationen hervorgerufen werden, durch die physiologische Interaktion an die Zellen der korrespondierenden Zellpopulation vermittelt werden. Zudem wurde die Frage im Kontext von postoperativen Komplikationen in Form einer simulierten Exposition gegenüber bakteriellen Krankheitserregern betrachtet. Damit wurde der klinische

Zusammenhang zwischen dem immunsuppressiven Effekt des operativen Eingriffs und dem Auftreten einer postoperativen Sepsis dargestellt.

## 5.2 T-ZELLEN UND ANTIGENPRÄSENTIERENDE ZELLEN ALS TEIL DER POSTOPERATIVEN IMMUNREAKTION

Antigenpräsentierende Zellen (APCs) und T-Zellen spielen eine zentrale Rolle bei der zielgerichteten Abwehrfunktion des Immunsystems (72). Durch diese entscheidende Rolle, die diese Zelltypen inne haben und die Störung dieser Funktion, nachgewiesen in zahlreichen Studien, (4,8,9,14,15) ergibt sich die hohe Relevanz zur Untersuchung dieser beiden Zellfraktionen und ihrer Interaktion.

Bisherige Studien fokussierten sich bei der Frage der gestörten Immunfunktion nach Trauma und Schock bzw. nach abdominalchirurgischen Eingriffen auf die Sekretion von Zytokinen und die Expression von Oberflächenmarkern als alleiniges Bewertungskriterium der Störung. Die zentrale Reaktion der beteiligten Zellen, die Interaktion miteinander, blieb dabei weitgehend unbeobachtet. Da die Interaktion von T-Zellen und APCs allerdings durch Zytokine und Oberflächenantigene (u.a. TLR, MHC II) vermittelt wird, konnte indirekt eine Störung der Kommunikation erwartet werden.

Offen bleibt dagegen die Frage, wie diese Störung im Einzelnen aussieht sowie von welcher der beteiligten Zellen sie ausgeht und welchen Effekt dieser funktionelle Defekt auf die kommunizierende Zelle hat. Die zu erwartende Reaktion wäre eine verminderte T-Zellfunktion, vermittelt durch die Kommunikation mit einer durch Trauma und Schock in ihrer Funktion beeinträchtigten antigenpräsentierenden Zelle. Diese Annahme ergibt sich aus dem natürlichen Ablauf der Abwehrkaskade, in deren Reihenfolge die T-Zelle der antigenpräsentierenden Zelle hinten angestellt ist.

### 5.2.1 SPEZIFISCHE ZELLAKTIVIERUNG

Zur Stimulation der APCs wurde im Sinne einer simulierten Exposition gegenüber exogenen Erregern *Lipopolysaccharid* (LPS) verwendet. Dieses Mitogen, welches Bestandteil der Zellmembran u.a. von *Escherichia coli* ist, bindet in Kombination mit *LBP* (*Lipopolyssacharide Binding Protein*) an den spezifischen LPS-Rezeptor CD14 auf den Oberflächen der APCs (74). In dieser Studie wurden die Zellen sowohl prä- also auch zwei Stunden postoperativ mit LPS *in vitro* stimuliert.

Die Stimulation CD3-positiver T-Zellen erfolgte mittels spezifischer Antikörper gegen die T-Zell Oberflächenmarker CD3 und CD28. AntiCD3 dient der Aktivierung der

T-Zellen über den T-Zellrezeptorkomplex. Zur Ausdifferenzierung naiver T-Zellen zu T-Helferzellen werden allerdings neben der Stimulation über den T-Zellrezeptor weitere Costimuli benötigt. Dabei spielt die Coaktivierung über CD28 eine entscheidende Rolle (75–77).

Ziel dieser Maßnahme war es, die klinisch relevante Situation zu simulieren, in welcher das Immunsystem nach dem operativen Eingriff mit einer schweren Infektion konfrontiert wird, die im klinischen Alltag eine letale Komplikation darstellen kann. Es konnte auf diese Weise die spezifische Aktivierung der beteiligten Zellgruppen beobachtet werden und deren Effekt auf die Kommunikation mit anderen Zellen.

### 5.2.1 BESTIMMUNG VON OBERFLÄCHENMARKERN PRÄ- UND POSTOPERATIV

Die Expression von Oberflächenmarkern durch T-Zellen und APCs und die Bestimmung und Beurteilung dieser Expression mittels Flowzytometrie ermöglicht eine Charakterisierung der Zellfunktion (55).

Dabei können den unterschiedlichen Zelltypen spezifische Oberflächenantigene zugeordnet werden, deren veränderte Expression nach abdominalchirurgischen Eingriffen im Vergleich zu präoperativ erhobenen Daten eine veränderte Zellfunktion beschreibt.

Mit Blick auf die untersuchten T-Zellen stellt die Expression von CD3 und CD4 einen zentralen Parameter dar. Beide Oberflächenantigene sind in Verbindung mit dem T-Zellrezeptor (TCR) der entscheidende Proteinkomplex zur Erkennung von präsentierten Peptiden durch APCs (26,34,87,88). Eine verminderte Expression dieser Marker stellt somit eine schwere Funktionsstörung der T-Zelle dar. Des Weiteren stellen eine Reihe weiterer Oberflächenmarker wichtige Cofaktoren zur korrekten Prozessierung exogener Antigene durch die T-Zelle dar (31–34). So kommt beispielsweise der Stimulation des Cofaktors CD28 eine besondere Rolle bei der Initiierung der IL-2 Synthese durch T-Zellen zu (89).

Des Weiteren liefern APC-spezifische Oberflächenmarker wie HLA-DR Informationen zur Funktionstüchtigkeit, da diese direkt an der Präsentation exogener Peptide beteiligt sind (26–28). Zudem gibt die Expression von CD14 als Rezeptor für LPS einen Hinweis auf die Sensitivität der APCs gegenüber exogenen Erregern, die dieses Molekül als Zellwandbestandteil tragen (35,36,90).

Deshalb kann durch die flowzytometrische Bestimmung von verschiedenen Oberflächenmarkern ein wichtiger Rückschluss auf die Funktionstüchtigkeit



verschiedener Zellen gezogen werden. Die vorteilhaften Möglichkeiten der angewandten Methodik liegen zum einen in der präzisen Bestimmung spezifischer Marker. Zum anderen kann so die veränderte Zellfunktion durch Trauma und Schock direkt beurteilt werden.

## 5.2.2 ZYTOKINSEKRETION ALS FUNKTIONELLER MARKER

Zur Charakterisierung der Zellfunktion wurden für die T-Zellen und die APCs unterschiedliche Zytokine nach 24 Stunden Zellkultur und Stimulation bestimmt, deren Funktion, Wirkung und Interaktion hier im Hinblick auf ihre Rolle nach chirurgischem Trauma und Blutverlust beschrieben werden soll.

Die in hohem Maße von APCs sezernierten Zytokine IL-1 $\beta$ , IL-6 und TNF- $\alpha$  induzieren innerhalb kurzer Zeit eine zunächst regional begrenzte Hyperinflammation. Die Sekretion dieser Botenstoffe erfolgt dabei über ortsansässige Immunzellen (vor allem Makrophagen und dendritische Zellen) nach Induktion durch das lokale Trauma des operativen Eingriffs (45,57,69,78–80). Der synergistische Effekt dieser drei und weiterer Zytokine ist ursächlich für die Entstehung einer zunächst lokal begrenzten Akut-Phase-Reaktion verantwortlich, die Teil der physiologischen Abwehrreaktion ist, im weiteren Verlauf jedoch zu schweren systemischen Komplikationen führen kann (7,10,12,13). Zudem besteht ein direkter Zusammenhang zwischen der Sekretion weiterer hepatischer Akut-Phase-Proteine (z.B. C-reaktives Protein) und der IL-6 Konzentration, die als laborchemischer Marker zur Beurteilung einer Sepsis herangezogen wird (50,51,81). Des Weiteren werden die proinflammatorischen Zytokine IL-2 und IFN- $\gamma$  sowie GM-CSF in erster Linie von T-Zellen ausgeschüttet und haben einen stimulierenden Effekt auf die Zelldifferenzierung und -aktivierung (22,34,82).

Neben der Sekretion proinflammatorischer Zytokine wird aber auch das antiinflammatorische Zytokin IL-10, das eine negative Rückkopplung zu IL-6 darstellt, von beiden beschriebenen Zellfraktionen sezerniert (44).

Insgesamt kann diese Kommunikation als Versuch des Immunsystems gedeutet werden, einer notwendigen Aktivierung zur Immunabwehr eine adäquate Antiinflammation gegenüber zu stellen, um überschießende Immunreaktionen zu vermeiden. Im Rahmen eines traumatisierenden Ereignisses jedoch offenbart sich dieses System in seinem Ablauf als weitreichend gestört (8,9,16,63,83).

Eine uneingeschränkte Spezifität der sezernierten Zytokine zu einer bestimmten Zellfraktion, wie oben postuliert, besteht allerdings meist nicht. Stattdessen können sowohl APCs als auch T-Zellen Zytokine sezernieren, die in dieser Studie bestimmt worden sind und als T-Zell- bzw. APC-spezifisch angegeben wurden. Insbesondere scheinen dendritische Zellen unter bestimmten Umständen vor allem T-Zell spezifisches IFN- $\gamma$  produzieren zu können (18,21,84–86).

Die Reinheit der isolierten Zellgruppen betrug jeweils mindestens 95%. Mittels der durchgeführten Selektion und dem Anlegen von Monokulturen in Verbindung mit der alleinigen Aktivierung der einzelnen Zellgruppen durch Stimulation in der Cokultur kann letztendlich von einer sehr hohen zellulären Spezifität der bestimmten Zytokine ausgegangen werden. Des Weiteren wurde die Spezifität der beurteilten Zytokine durch Messungen in den Kulturüberständen stimulierter Monokulturen aus APCs bzw. T-Zellen ermittelt.

Für die Detektion der Ursprungszellen eines Zytokins könnte in zukünftigen Studien die Detektion intrazellulärer Zytokine mittels Durchflusszytometrie verwendet werden. Diese Methode würde auch ermöglichen die aktuelle Zytokinproduktion der Zellen zum Zeitpunkt der Messung zu bestimmen, was bei der Messung der Zytokine in den Zellkulturüberständen nicht durchführbar ist. Die Detektion darin entspricht verfahrensbedingt nur einer Darstellung der gesamten Zytokinproduktion über den Zeitraum der Zellkultur, zusätzlich beeinflusst durch die jeweilige Halbwertszeit der zu messenden Zytokine. Eine Aussage über die Kinetik der Sekretion ist bei der hier angewandten Methode nicht möglich.

### 5.3 BIO-ASSAY

Ein Ziel dieser Studie war die Etablierung eines methodischen Verfahrens, um den Zusammenhang zwischen der Interaktion von T-Zellen und APCs und der kompromittierten Immunantwort nach abdominalchirurgischen Eingriffen zu verstehen.

Walz *et al.* zeigten in ihrer Studie, dass die unterdrückte Immunabwehr möglicherweise durch eine gestörte T-Zellfunktion an die kommunizierenden APCs vermittelt wird. (49,73) Dabei wurde vor allem gezeigt, dass unabhängig vom Zustand der antigenpräsentierenden Zelle (geschockt vs. nativ), eine Störung der Zellfunktion alleine durch die Interaktion mit der geschockten T-Zelle zu beobachten war.

Zum tieferen Verständnis wurden nun hierzu verschiedene Zellkulturen angelegt, bei denen stets präoperativ (nativ) oder postoperativ gewonnene Zellen von chirurgischen Patienten mit verschiedenen Zelllinien coinkubiert wurden. Zusätzlich wurde der Einfluss der Zellen von Patienten untersucht, die postoperativ eine Sepsis entwickelten (septisch).

Die Beurteilung der gestörten Zellfunktion durch den chirurgischen Eingriff erfolgte nun *in vitro* durch die Bestimmung oben genannter Parameter der kommunizierenden Zelle in der Cokultur im Sinne eines Bio-Assays.

Dieser Bio-Assay beruht auf der Annahme, dass der Defekt einer Zelle durch eine Störung der Funktion der mit ihr interagierenden Zelle nachgewiesen werden kann. Dadurch ergab sich der Vorteil eines lebensnahen und zugleich hochspezifischen Versuchsaufbaus *in vitro*, der zudem den modulatorischen Effekt der Zellinteraktion gesondert darstellt.

Zur Präzisierung der gewonnenen Erkenntnisse wurde jede Zellkultur mehrfach mit verschiedenen nativen Zellen verschiedenen Ursprungs angelegt. Neben der Coinkubation von T-Zellen und APCs, die aus dem Vollblut abdominalchirurgischer Patienten gewonnen wurden, dienten zur Kontrolle CD3<sup>+</sup> T-Zellen sowie CD14<sup>+</sup> APCs von einem einzigen gleichbleibenden gesunden Spender. Ein Pooling von Zellen verschiedener Spender wurde als nicht praktikabel verworfen, da bereits separierte Zellen über einen langen Zeitraum nicht erfolgreich zu kultivieren waren und ein exogener Stimulus dadurch nicht sicher ausgeschlossen werden konnte.

Als weitere Kontrolle kamen etablierte Leukämiezelllinien zum Einsatz. Als CD3<sup>+</sup> Kontrollzellen wurden dabei JURKAT T-Zellen verwendet (91–93). Zur Kontrolle der CD14<sup>+</sup> APCs kamen Zellen der Zellreihe THP-1 zum Einsatz (46,94,95). Diese Zelllinien wurden aufgrund ihrer genetischen Ähnlichkeit zu physiologischen Zellen und ihrer Fähigkeit, die für diese Studie relevanten Zytokine zu produzieren, ausgewählt. (96–98)

Gleichzeitig gilt es zu bedenken, dass die Aussagekraft der Kontrolle mittels fremder Zellen eingeschränkt sein könnte, zum einen durch die unkontrollierbare Einbringung von Antigenen in die Zellkultur und die entsprechende Immunreaktion, zum anderen durch die nicht mit Sicherheit zu gewährleistende genetische Integrität der Zellen aus den Leukämiezelllinien (99–102).

Mit der Verwendung mehrerer verschiedener Zelllinien, aus denen stets native, also durch Trauma, Schock oder Sepsis unbeeinflusste Zellen isoliert wurden, ergaben

sich Vorteile bei der Beurteilung der generierten Ergebnisse. Zum einen ließ sich dadurch der untersuchte Effekt der zellvermittelten Immunsuppression nach operativen Eingriffen nicht alleine an patienteneigenen, sondern ebenso an patientenfremden Zellen nachweisen. Zum anderen war hierdurch eine Qualitätskontrolle innerhalb der Studie gegeben.

Der vorgelegten Studie wurde ein Versuchsaufbau *in vitro* zugrunde gelegt. Mittels dieses Vorgehens wurde eine kontrollierte künstliche Umgebung außerhalb eines lebenden Organismus geschaffen. Damit konnten verschiedene exogene Einflussfaktoren auf das Versuchsgeschehen von vorne herein kontrolliert bzw. gezielt aus- oder eingeschlossen werden. Zudem ergibt sich durch die Anwendung eines *in vitro* Versuchsaufbaus der Vorteil einer fokussierten Betrachtung eines bestimmten zu untersuchenden Effekts. Dabei ist es außerdem möglich einzelne gewünschte Einflussfaktoren entsprechend des Studienprotokolls zu reproduzieren oder zu modifizieren. Allerdings gilt zu Bedenken, dass eine Interpretation solch gewonnener Ergebnisse immer vor dem Hintergrund geschehen muss, dass die gemachten Beobachtungen *in vivo* zumeist in einem deutlich komplexeren Kontext zu sehen sind.

## 5.4 INTERPRETATION DER GEWONNENEN ERGEBNISSE

### 5.4.1 EXPRESSION VON OBERFLÄCHENMARKERN

Die Untersuchung von Oberflächenmolekülen ergab für alle gemessenen T-Zell spezifischen Marker eine verringerte Expression zwei Stunden nach dem abdominealchirurgischen Eingriff. Dabei ergab die Bestimmung der wichtigen Marker CD3, als Bestandteil des T-Zellrezeptors, und CD28, als Costimulus, sogar einen signifikanten Rückgang der Expression. Nachdem andere Studien die zentrale Bedeutung dieser Oberflächenmarker beschrieben hatten (89,103), konnten Albertsmeier *et al* diese Beobachtung (104) an postoperativen Patienten bestätigen. Diese funktionelle Beeinträchtigung der T-Zelle wurde in der vorliegenden Untersuchung auch für T-Zellen septischer Patienten gezeigt.

Weitere T-Zell spezifische Oberflächenmarker ergaben postoperativ ebenfalls einen Rückgang der Expression, aber ohne dabei eine signifikante Abnahme zu zeigen. Da die im Versuchsaufbau bestimmten Oberflächenmarker alle Teil der strukturierten Immunantwort sind, kann somit bei einer umfassend verringerten Ausbildung dieser Proteine von einer Störung der T-Zellfunktion ausgegangen werden.

APCs zeigten zwei Stunden nach der Operation eine deutliche Steigerung von spezifischen Oberflächenantigenen. Dabei ergaben die Messungen von CD14, CD86 und

HLA-DR signifikant erhöhte Werte im Vergleich zu präoperativen Messungen. Dabei kommt der Quantität von CD14 auf der Zelloberfläche als Rezeptor für LPS eine entscheidende Rolle einer funktionierenden Immunantwort zu (90). Ebenso spielt die Expression von HLA-DR eine zentrale Rolle, da darüber die Präsentation exogener Peptide an die T-Zelle stattfindet (40). CD86 hingegen dient im Komplex mit CD80 der Costimulierung von interagierenden T-Zellen (32). Mit der deutlich gesteigerten Expression dieser Oberflächenmarker konnte man hier zunächst von keiner Störung der Immunabwehr durch eine verminderte APC-Funktion ausgehen.

In der Sepsis ergaben die Studienergebnisse einen Rückgang der Expression von HLA-DR und CD80. Eine Reduzierung von HLA-DR auf der Zelloberfläche bei Sepsis wurde zuvor bereits beschrieben (105) und scheint mit der postoperativen Immunsuppression in Zusammenhang zu stehen. Für eine verminderte Expression von CD80 hingegen konnte hingegen eine Assoziation mit reduzierter Sterblichkeit bei Sepsis gezeigt werden (106).

Im Vergleich zur Verschlechterung der Abwehrfunktion durch eine gestörte T-Zellfunktion nach Trauma, Schock und Sepsis ist durch die erhöhte Expression spezifischer Oberflächenmarker von APCs von keiner Immunsuppression in diesem Sinne auszugehen.

Im Gegensatz zu den weiter unten aufgeführten Ergebnissen der spezifischen Zytokinsekretion nach Cokultur erfolgte bei der Bestimmung der Oberflächenantigene keine *in vitro* Stimulation zur Simulation einer bakteriellen Infektion mit LPS oder antiCD3 / antiCD28. Somit wurde ausschließlich die Auswirkung auf die Zellfunktion durch den operativen Eingriff bzw. in der Sepsis ermittelt.

#### 5.4.2 ISOLIERTE BETRACHTUNG VON REGULATORISCHEN T-ZELLEN ( $T_{\text{REG}}$ ) UND *MYELOID DERIVED SUPPRESSOR CELLS* (MDSCs)

Eine isolierte Betrachtung der regulatorischen T-Zellen ( $T_{\text{reg}}$ ), die sich u.a. durch die Expression von CD4 und CD25 sowie der fehlenden Expression von CD127 charakterisieren lassen, ergab eine quasi unveränderte Zahl dieser Zellgruppe zwei Stunden nach dem operativen Eingriff. Bei septischen Patienten konnte lediglich eine geringe aber nicht signifikante Erhöhung der Zellzahl festgestellt werden.  $T_{\text{reg}}$  können zur

Verminderung der Th1-vermittelten Immunantwort führen und dabei den sogenannten Th1/Th2-*Shift* zugunsten einer Th2-orientierten Immunantwort initiieren (107,108). Studien zeigten bereits einen Anstieg dieser Zellgruppe ab dem ersten postoperativen Tag, der eine Verschiebung zu einer Th2-kontrollierten Immunantwort erklärt (104,109).

Die vorliegenden Daten können diesen Zusammenhang zwischen einer verminderten Sekretion von IL-2 und IFN- $\gamma$  im Sinne eines Th1/Th2-*Shifts* durch T<sub>reg</sub> zwei Stunden nach der Operation nicht bestätigen. Dies mag durch den kurzen Zeitabstand von lediglich zwei Stunden zu der Operation bedingt sein. Mit Blick auf die gewonnenen Daten bei septischen Patienten steht der signifikante Anstieg der Th1-spezifischen Zytokine IL-2 und IFN- $\gamma$  durch native T-Zellen nach Kontakt zu postoperativen APCs allerdings im Einklang zu einer weiter verringerten Anzahl von T<sub>reg</sub> bei Sepsis. Somit liegt der Einfluss von regulatorischen T-Zellen auf eine veränderte Zytokinsekretion nahe, kann aber aktuell nicht sicher bewiesen werden.

Warum es bei septischen Patienten zu einer weiteren Verminderung von CD127 kam, die charakteristisch für die T<sub>reg</sub> ist und als IL-7 Rezeptor fungiert (37), kann letztendlich nicht geklärt werden. Jedoch zeigten Venet *et al*, dass IL-7 zur Wiederherstellung einer normalen Zellfunktion bei septischen Patienten eine zentrale Rolle spielt (110), womit die erhöhte Expression von CD127 von Vorteil für eine Normalisierung der Immunantwort wäre.

Zudem muss gleichzeitig als weitere Ursache eines immunmodulatorischen Effekts der gemessene Anstieg an CD14<sup>+</sup>/HLA-DR<sup>-</sup> *Myeloid -Derived Suppressor Cells* (MDSC) zwei Stunden postoperativ und während des septischen Zustands diskutiert werden. Der immunmodulatorische Effekt dieser heterogenen Zellgruppe ist gegenwärtig Bestandteil zahlreicher Untersuchungen und konnte in einem ähnlichen Versuchsaufbau von

Albertsmeier

*et al* bereits beschrieben werden (104,111,112). Durch die vermehrte Produktion des Enzyms Arginase-1 durch MDSCs verringern sich der Argininspiegel im Blut, wodurch die Proliferation von Lymphozyten und die Ausbildung des T-Zellrezeptors beeinträchtigt wird (113). Cuenca *et al* beschreiben das vermehrte Auftreten von MDSCs nach Trauma und Sepsis hingegen als möglichen immunologischen Vorteil (114). Die Autoren beschreiben dabei die verbesserte Immunüberwachung (*Immune Surveillance*) sowie eine Verbesserung der angeborenen Immunantwort, die durch MDSCs vermittelt wird. Ob die MDSCs dabei einen gesicherten Einfluss auf die Ausdifferenzierung von Monozyten haben, muss trotz der gemachten Erkenntnisse offen bleiben. Innerhalb der Zellgruppe der APCs stellen Monozyten eine eigene Population dar, deren

Ausdifferenzierung im zeitlichen Verlauf etwa 48 Stunden nach Aktivierung dauert. Da im gemachten Versuchsaufbau die Zellkultur 24 Stunden inkubiert wurde, kann demnach abschließend keine gesicherte Aussage zu einem entscheidenden Einfluss gemacht werden.

Insgesamt kann man anhand der erhobenen Daten eine Störung der T-Zellfunktion nach abdominalchirurgischen Eingriffen erkennen, die sich im septischen Stadium zu normalisieren scheint. Die gemachten Beobachtungen lassen allerdings keine entscheidende Störung der Funktion von APCs im postoperativen Stadium zu. Im weiteren septischen Krankheitsverlauf bestätigen sich allerdings der Verlust basaler Funktionen der APCs wie eine verminderte MHC-II Expression. Ein besonderes Augenmerk sollte dabei den beiden Zellgruppen der T<sub>reg</sub>s und der MDSCs gelten, deren zentrale Rolle bei der Modulation der Immunantwort vermutet wird, allerdings im gemachten Versuchsaufbau nicht direkt erfasst wurde.

#### 5.4.3 SEKRETION VON ZYTOKINEN

Die gemessene verminderte Sekretion von IL-2, IL-10 und IFN- $\gamma$  nach Coinkubation von nativen T-Zellen und postoperativ isolierten APCs weist auf eine Funktionsstörung der APCs hin. Diese verminderte Fähigkeit zur Stimulation von T-Zellen ist durch das operative Trauma bedingt und steht in einem gewissen Gegensatz zur vermehrten Expression von Oberflächenantigenen. Dabei zu berücksichtigen ist die Stimulation der Zellkultur mit LPS, die in dem gewählten Versuchsaufbau bei der Bestimmung der Oberflächenmarker nicht erfolgt war. Während dieses Ergebnis durch die Verwendung von Kontrollzellen eines standardisierten Kontrollpatienten bestätigt werden konnte, zeigte die Kontrolle mit T-Zellen der Leukämiezelllinie JURKAT lediglich übereinstimmende Ergebnisse bei der Bestimmung des antiinflammatorischen Zytokins IL-10. Im Falle der Bestimmung von IL-2 und IFN- $\gamma$  lag die Konzentration unterhalb des Detektionsniveaus der verwendeten Nachweismethode. Eine Erklärung hierfür könnte sein, dass der Co-Faktor CD4 von JURKAT T-Zellen des verwendeten Stamms D1.1 nicht exprimiert wird (Herstellerangaben). Dadurch fehlte ein wesentlicher Stimulus zur Differenzierung nativer T-Zellen zu Th1-Helferzellen und damit die Fähigkeit zur Sekretion der Th1-spezifischen Zytokine IL-2 und IFN- $\gamma$ . In diesem Zusammenhang ist anzumerken, dass nach Coinkubation der JURKAT T-Zellen mit septischen APCs ein deutlicher Anstieg dieser beiden Zytokine im Zellüberstand gemessen werden konnte. Möglicherweise bewirkt die Interaktion mit septischen APCs einen entsprechend starken

Stimulus, der diesen Effekt erklärt und zudem bei der Co-Inkubation mit nativen CD4+ Zellen des Kontrollpatienten ebenso zu beobachten war.

Die Untersuchung von APCs septischer Patienten zeigte im *Bio-Assay* mit patienteneigenen Zellen eine mit der postoperativen Situation vergleichbare Funktionsstörung. Die Ergebnisse der Cokulturen mit T-Zellen des gesunden Probanden und aus der Leukämiezelllinie zeigten zwar in sich eine gleiche Tendenz der veränderten APC-Funktion, bestätigten aber nicht das Ergebnis aus der Cokultur mit Patientenzellen.

Mit Blick auf die Sekretion APC-spezifischer Zytokine zur Charakterisierung der T-Zellfunktion zeigte sich eine fast durchgängig vermehrte Zytokinausschüttung. Insbesondere das proinflammatorische Zytokin IL-6 zeigte nach Cokultur eine signifikant erhöhte Sekretion durch native APCs, was als stimulierender Effekt geschockter T-Zellen zu werten ist. Gleichzeitig zeigten andere proinflammatorische Zytokine wie IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$  eine deutliche, wenn auch nicht signifikante Erhöhung im Vergleich zu präoperativ erhobenen Werten. IL-10 als antiinflammatorisches Zytokin zeigte, ähnlich wie bei der Beurteilung der APC-Funktion, eine signifikante Erhöhung. Mit der Verwendung von APCs aus dem Blut des Kontrollpatienten konnten diese Ergebnisse bestätigt werden. Eine Ausnahme bildete die Sekretion von GM-CSF, die im Vergleich zu präoperativ erhobenen Werten auf einem ähnlich hohem Niveau blieb. Die Verwendung von Leukämiezellen der Linie THP-1 zur weiteren Kontrolle der Ergebnisse ergab für alle gemessenen Parameter (mit Ausnahme von IL-6) eine Verminderung der Sekretion, womit von einer Verschlechterung der APC-Funktion nach Interaktion mit T-Zellen operativer Patienten ausgegangen werden muss. Im Falle der Bestimmung von TNF- $\alpha$  und GM-CSF konnte sogar ein signifikanter Rückgang beobachtet werden. Damit konnte der Effekt einer verbesserten Immunantwort der APCs nach Cokultur mit T-Zellen operativer Patienten für Zellen der Linie THP-1 nicht bestätigt werden. Eine Ursache dieses Effekts bleibt bei bestehender Fähigkeit zur Zytokinsekretion durch Zellen der verwendeten Leukämiezelllinie Spekulation. Daraus ergibt sich jedoch die Frage, ob die verwendete Leukämiezelllinie für eine Anwendung mit der gemachten Methode geeignet ist.

Alle Cokulturen wurden entsprechend einer Exposition gegenüber eines bakteriellen Erregers mit LPS bzw. antiCD3/antiCD28 einer einzigen Konzentration stimuliert. Der Effekt der Stimulation wurde durch eine Negativkontrolle überprüft. Die gut reproduzierbaren Ergebnisse dieser Versuche machten eine Erprobung weiterer Konzentrationen im Rahmen dieser Versuche nicht notwendig. Gleichwohl ist es eine klinisch relevante Frage, wie sich insbesondere bei septischen Patienten



unterschiedliche Stimulationen - entsprechend unterschiedlich starker infektiöser Stimuli  
- auf die Funktion der interagierenden Zellen auswirken.

## 5.5 THEORIE EINES „SECOND HIT“

Eine mögliche Erklärung für die inadäquate Immunantwort auf exogene Stimuli bietet die Theorie des *Second Hit* (115–117). Dieser Annahme zufolge tritt eine weitgehende Erschöpfung der Immunfunktion durch die Inflammation infolge des chirurgischen Eingriffes ein. Auf exogene Antigene, die in dieser Studie als Stimulation mit LPS bzw. antiCD3 und antiCD28 simuliert wurden, kann dann nicht mehr adäquat reagiert werden.

Die kurze zeitliche Abfolge zweier Ereignisse, die die Aktivierung des Immunsystems und deren Zellen zur Folge hat, überfordert möglicherweise die Kapazität der Abwehrzellen zu einer adäquaten Immunantwort. Dabei scheint der Effekt dieses *Second Hit* sich insbesondere in einer verminderten Funktionsfähigkeit der APCs widerzuspiegeln. Diese inadäquate Reaktion auf eine Infektion des Organismus überträgt sich dabei durch die Interaktion auf die T-Zellen, deren Zytokinausschüttung nach Coinkubation deutlich reduziert war.

Hingegen zeigte sich die Beeinflussung der T-Zellfunktion durch den *Second Hit* als weniger ausgeprägt. Die T-Zellen konnten die Funktion nativer APCs mit Blick auf die Zytokinsekretion durch die Interaktion beider Zelltypen sogar verbessern.

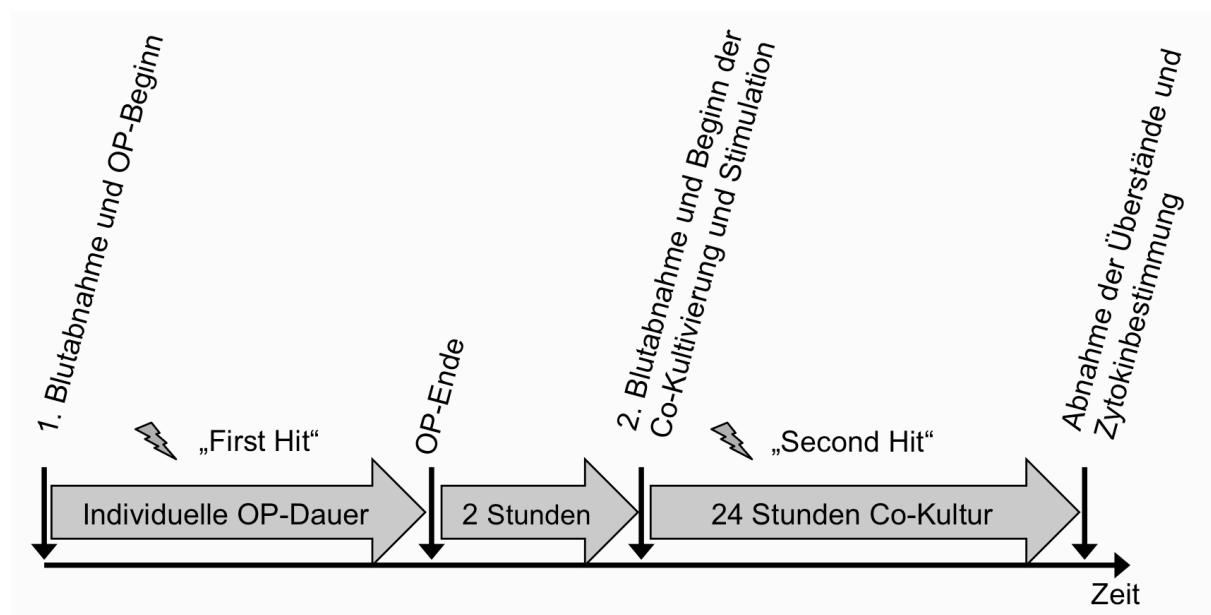


Abb.19 Veranschaulichung der zeitlichen Abfolge, die bei der Erstellung der Cokulturen angewandt wurde mit der Darstellung des „Second Hit“ zur Erklärung der defizitären Zellfunktion.

## 5.6 KLINISCHE RELEVANZ

Große abdominalchirurgische Eingriffe bedingen eine postoperative Dysfunktion der zellulären Immunabwehr. Dieser kompromittierende Effekt auf die Abwehrfunktion des Körpers bedeutet für die Patienten ein erhöhtes Risiko für das Auftreten einer Sepsis, eines Multiorganversagens und letztlich eine erhöhte Sterbewahrscheinlichkeit (7–10,12,13).

Ein weiterführendes Verständnis der Mechanismen, die bei einer geregelten Immunabwehr in Gang kommen, trägt weiter dazu bei, dass entsprechende Maßnahmen im Nachgang einer OP ergriffen werden können, um einer Sepsis und den damit verbundenen fatalen Komplikationen vorzubeugen.

Die funktionellen Defizite der T-Zelle, die durch die Interaktion mit APC ausgelöst zu werden scheinen, wurden als eine wichtige Ursache für die klinische Problematik identifiziert und sollten daher weiter im Fokus zukünftiger Forschung stehen. Eine Stabilisierung der T-Zellfunktion nach operativen Eingriffen könnte ein wichtiger Schritt in die richtige Richtung sein. Eine Optimierung der Funktion von APCs hingegen könnte sogar einen Schritt weiter bedeuten, da dadurch die Funktionsfähigkeit beider interagierender Zellgruppen aufrechterhalten werden könnte.

Darüber hinaus können Erkenntnisse zur Verbesserung gestörter Immunsysteme auch für andere Patientengruppen von Bedeutung werden. Neben Patienten, die aufgrund operativer Eingriffe oder akzidentieller Traumata ein temporär supprimiertes Immunsystem haben, könnten chronisch immunsupprimierte Patienten wie HIV-Infizierte oder onkologische Patienten unter Chemotherapie von den Erkenntnissen zur Interaktion von Immunzellen langfristig profitieren.

## 5.7 AUSBLICK

Postoperative Komplikationen, die durch eine Suppression des Immunsystems bedingt werden, bleiben eine häufig letal verlaufende und damit ernst zu nehmende Gefahr bei operativen Eingriffen. Krankheitszustände wie Sepsis und ein damit verbundenes MOF können als direkte Folge dieses Defekts identifiziert werden. Zur Optimierung der medizinischen Behandlung dieser Komplikationen ist ein grundlegendes Verständnis der zu beobachteten Störungen unabdingbar. Das Verständnis zellulärer

Mechanismen und der offenkundigen Störungen ebendieser Funktionen bilden daher einen wichtigen Baustein bei der Entwicklung neuer Behandlungsstrategien.

In einem nächsten Schritt könnte eine erweiterte Nutzung der in dieser Studie angewandten Methodik des Zytokin Bioassays, weitere vielversprechende Erkenntnisse auf dem Gebiet der postoperativen Immunsuppression bringen. Dabei implizieren die gewonnenen Resultate, dass eine Anwendung der gemachten Methode zur Kontrolle der Ergebnisse prinzipiell als möglich erscheint.

Des Weiteren sollte nun auch die Erkenntnis weiter im Fokus stehen, dass mit hoher Wahrscheinlichkeit defizitäre APCs dafür verantwortlich sind, dass eine adäquate Immunantwort nach abdominalchirurgischen Eingriffen nicht möglich ist.

Mit der weiter präzisierten Kenntnis der Vorgänge der gestörten Immunantwort nach abdominalchirurgischen Eingriffen stellt sich somit die Frage, wie man mit klinischen Mitteln die Gefahr der Sepsis und ihren Komplikationen behandeln kann. Immunmodulatorische Substanzen könnten dabei eine wichtige Rolle spielen und sollten daher weiter auf ihren unmittelbaren Effekt auf APCs hin untersucht werden. So konnte *in vitro* bereits für das Steroidhormon Dehydroepiandrosteron (DHEA) eine Verbesserung der zellulären Immunantwort von PBMCs nach abdominalchirurgischen Eingriffen nachgewiesen werden (70).

## 6 ZUSAMMENFASSUNG

Der supprimierende Effekt abdominalchirurgischer Eingriffe auf das Immunsystem setzt den menschlichen Körper einem erhöhten Risiko für postoperative und insbesondere infektiologische Komplikationen aus.

Ziel dieser Studie war es die zellulären Ursachen dieser postoperativen Immunsuppression weiter zu ergründen. Dazu wurde ein experimentelles Studienmodell entwickelt, bei dem *in vitro* der Effekt des operativen Traumas auf T-Zellen und antigenpräsentierende Zellen (APCs) sowie auf deren physiologische Interaktion untersucht werden konnte. Zur Beurteilung der veränderten Zellfunktion prä- und postoperativ wurden zum einen die Expression zellspezifischer Zytokine nach 24-stündiger stimulierter Cokultur bestimmt. Dazu wurden verschiedene Cokulturen aus nativen, postoperativ gewonnenen oder septischen T-Zellen und APCs angelegt. Zum anderen wurde die Expression von Oberflächenmarkern vor und nach dem operativen Eingriff beurteilt.

In diesen Versuchen konnte gezeigt werden, dass die Ursache der globalen Immunstörung möglicherweise von einer funktionellen Störung der antigenpräsentierenden Zellen ausgeht. So waren postoperative APCs unter Stimulation durch LPS nach Coinkubation mit nativen T-Zellen nicht in der Lage, deren Zytokinsekretion zu induzieren. Tatsächlich zeigte sich diese sogar vermindert. Ein ähnlicher Effekt konnte bei der Funktionsprüfung septischer APCs beobachtet werden.

Im Gegensatz dazu führten postoperative T-Zellen, die mit antiCD3 und antiCD28 im Sinne einer Exposition gegenüber Bakterien stimuliert wurden, eine Verbesserung der Funktion nativer APCs nach Coinkubation. T-Zellen aus dem Blut septischer Patienten hingegen konnten APC nicht adäquat stimulieren.

Mit der Bestimmung von Oberflächenantigenen von APCs und T-Zellen konnte zudem der immunmodulatorische Effekt abdominalchirurgischer Eingriffe, der aus anderen Studien bekannt ist, bestätigt werden. Eine isolierte Betrachtung von zellulären Untergruppen legte nahe, dass *Myeloid Derived Suppressor Cells* (MDSC) und regulatorische T-Zellen ( $T_{reg}$ ) mit Blick auf ihre modulatorischen Eigenschaften gegenüber T-Zellen und APCs einen entscheidenden Einfluss auf die postoperative Immunantwort haben könnten.

## 7 LITERATURVERZEICHNIS

1. Ulevitch RJ. Molecular mechanisms of innate immunity. *Immunol Res.* 2000;21(2-3):49–54.
2. Brown E, Atkinson JP, Fearon DT. Innate immunity: 50 ways to kill a microbe. *Curr Opin Immunol.* Februar 1994;6(1):73–4.
3. Murphy K. Janeway's immunobiology. 8th ed. New York: Garland Science; 2012. 868 p.
4. Oberholzer A, Oberholzer C, Moldawer LL. Sepsis syndromes: understanding the role of innate and acquired immunity. *Shock Augusta Ga.* August 2001;16(2):83–96.
5. Fearon DT, Locksley RM. The instructive role of innate immunity in the acquired immune response. *Science.* 5. April 1996;272(5258):50–3.
6. Oberholzer A, Oberholzer C, Moldawer LL. Cytokine signaling--regulation of the immune response in normal and critically ill states. *Crit Care Med.* April 2000;28(4 Suppl):N3–12.
7. Pruitt JH, Copeland EM 3rd, Moldawer LL. Interleukin-1 and interleukin-1 antagonism in sepsis, systemic inflammatory response syndrome, and septic shock. *Shock Augusta Ga.* April 1995;3(4):235–51.
8. Angele MK, Faist E. Clinical review: Immunodepression in the surgical patient and increased susceptibility to infection. *Crit Care.* 2002;6(4):298–305.
9. Abraham E. Physiologic stress and cellular ischemia: relationship to immunosuppression and susceptibility to sepsis. *Crit Care Med.* Mai 1991;19(5):613–8.
10. Keel M, Trentz O. Pathophysiology of polytrauma. *Injury.* Juni 2005;36(6):691–709.
11. McKay IA, Leigh IM. Epidermal cytokines and their roles in cutaneous wound healing. *Br J Dermatol.* Juni 1991;124(6):513–8.
12. Vollmar B. [Pathophysiological basis of surgery-linked sepsis]. *Chir Z Für Alle Geb Oper Medizen.* März 2011;82(3):199–207.
13. Tsukamoto T, Chanthaphavong RS, Pape H-C. Current theories on the pathophysiology of multiple organ failure after trauma. *Injury.* Januar 2010;41(1):21–6.
14. Kimura F, Shimizu H, Yoshidome H, Ohtsuka M, Miyazaki M. Immunosuppression following surgical and traumatic injury. *Surg Today.* September 2010;40(9):793–808.
15. Gentile LF, Cuenca AG, Efron PA, Ang D, McKinley BA, Moldawer LL, u. a. Persistent inflammation and immunosuppression: A common syndrome and new horizon for surgical intensive care. *J Trauma Acute Care Surg.* Juni 2012;72(6):1491–501.

16. Angele MK, Chaudry IH. Surgical trauma and immunosuppression: pathophysiology and potential immunomodulatory approaches. *Langenbecks Arch Surg Dtsch Ges Für Chir.* August 2005;390(4):333–41.
17. Germain RN. MHC-dependent antigen processing and peptide presentation: providing ligands for T lymphocyte activation. *Cell.* 28. Januar 1994;76(2):287–99.
18. Moore KW, de Waal Malefyt R, Coffman RL, O'Garra A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol.* 2001;19:683–765.
19. Dinarello CA. Biologic basis for interleukin-1 in disease. *Blood.* 15. März 1996;87(6):2095–147.
20. Angele MK, Knoferl MW, Schwacha MG, Ayala A, Bland KI, Cioffi WG, u. a. Hemorrhage Decreases Macrophage Inflammatory Protein 2 and Interleukin-6 Release. *Ann Surg.* Mai 1999;229(5):651.
21. Dinarello CA. PРоinflammatory and anti-inflammatory cytokines as mediators in the pathogenesis of septic shock. *CHEST J.* 1. Dezember 1997;112(6\_Supplement):321S – 329S.
22. Meisel C, Schefold JC, Pschowski R, Baumann T, Hetzger K, Gregor J, u. a. Granulocyte–Macrophage Colony-stimulating Factor to Reverse Sepsis-associated Immunosuppression: A Double-Blind, Randomized, Placebo-controlled Multicenter Trial. *Am J Respir Crit Care Med.* Oktober 2009;180(7):640–8.
23. Hamilton JA. Colony-stimulating factors in inflammation and autoimmunity. *Nat Rev Immunol.* Juli 2008;8(7):533–44.
24. Kidd P. Th1/Th2 balance: the hypothesis, its limitations, and implications for health and disease. *Altern Med Rev J Clin Ther.* August 2003;8(3):223–46.
25. Infante-Duarte C, Kamradt T. Th1/Th2 balance in infection. *Springer Semin Immunopathol.* 1999;21(3):317–38.
26. Ayala A, Ertel W, Chaudry IH. Trauma-induced suppression of antigen presentation and expression of major histocompatibility class II antigen complex in leukocytes. *Shock Augusta Ga.* Februar 1996;5(2):79–90.
27. Mantegazza AR, Magalhaes JG, Amigorena S, Marks MS. Presentation of Phagocytosed Antigens by MHC Class I and II. *Traffic.* 2013;14(2):135–52.
28. Chain BM, Kaye PM, Shaw MA. The biochemistry and cell biology of antigen processing. *Immunol Rev.* Dezember 1988;106:33–58.
29. Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature.* 19. März 1998;392(6673):245–52.
30. Yewdell JW, Reits E, Neefjes J. Making sense of mass destruction: quantitating MHC class I antigen presentation. *Nat Rev Immunol.* Dezember 2003;3(12):952–61.
31. Grewal IS, Flavell RA. The role of CD40 ligand in costimulation and T-cell activation. *Immunol Rev.* Oktober 1996;153:85–106.

32. Van Gool SW, Vandenberghe P, de Boer M, Ceuppens JL. CD80, CD86 and CD40 provide accessory signals in a multiple-step T-cell activation model. *Immunol Rev.* Oktober 1996;153:47–83.
33. Miki-Hosokawa T, Hasegawa A, Iwamura C, Shinoda K, Tofukuji S, Watanabe Y, u. a. CD69 Controls the Pathogenesis of Allergic Airway Inflammation. *J Immunol.* 15. Dezember 2009;183(12):8203–15.
34. Furtado GC, Curotto de Lafaille MA, Kutchukhidze N, Lafaille JJ. Interleukin 2 signaling is required for CD4(+) regulatory T cell function. *J Exp Med.* 16. September 2002;196(6):851–7.
35. Zdzienicka HA, Jenmalm MC. Reduced levels of soluble CD14 in atopic children. *Clin Exp Allergy J Br Soc Allergy Clin Immunol.* April 2004;34(4):532–9.
36. Ziegler-Heitbrock L. The CD14+ CD16+ blood monocytes: their role in infection and inflammation. *J Leukoc Biol.* 3. Januar 2007;81(3):584–92.
37. Doms H. Interleukin-7: Fuel for the autoimmune attack. *J Autoimmun.* September 2013;45:40–8.
38. Gardiner KR, Crook AD, Halliday MI, Rowlands BJ. Class II major histocompatibility complex antigen expression on peripheral blood monocytes in patients with inflammatory bowel disease. *Gut.* April 1994;35(4):511–6.
39. McHoney M, Klein NJ, Eaton S, Pierro A. Decreased monocyte class II MHC expression following major abdominal surgery in children is related to operative stress. *Pediatr Surg Int.* April 2006;22(4):330–4.
40. Mach B, Steimle V, Martinez-Soria E, Reith W. Regulation of MHC class II genes: lessons from a disease. *Annu Rev Immunol.* 1996;14:301–31.
41. Kox WJ, Volk T, Kox SN, Volk HD. Immunomodulatory therapies in sepsis. *Intensive Care Med.* 2000;26 Suppl 1:S124–8.
42. Thijs LG, Hack CE. Time course of cytokine levels in sepsis. *Intensive Care Med.* November 1995;21 Suppl 2:S258–63.
43. Hildebrand F, Pape H-C, Krettek C. [The importance of cytokines in the posttraumatic inflammatory reaction]. *Unfallchirurg.* Oktober 2005;108(10):793–4, 796–803.
44. Sabat R. IL-10 family of cytokines. *Cytokine Growth Factor Rev.* Oktober 2010;21(5):315–24.
45. Nambu A, Nakae S, Iwakura Y. IL-1 $\beta$ , but not IL-1 $\alpha$ , is required for antigen-specific T cell activation and the induction of local inflammation in the delayed-type hypersensitivity responses. *Int Immunol.* Mai 2006;18(5):701–12.
46. Willheim M, Gessl A, Berger R, Schedle A, Luger T, Föster O, u. a. IL-6 augments Fc  $\epsilon$ 1 receptor (Fc  $\epsilon$ 1R/CD23) expression on human monoblastic/monocytic cell lines U937, THP-1, and Mono-Mac-6 but not on blood monocytes. Regulatory effects of IL-4 and IFN- $\gamma$ . *J Immunol Baltim Md* 1950. 15. September 1991;147(6):1837–42.

47. Montoya MC, Sancho D, Vicente-Manzanares M, Sánchez-Madrid F. Cell adhesion and polarity during immune interactions. *Immunol Rev.* August 2002;186:68–82.
48. Delon J, Stoll S, Germain RN. Imaging of T-cell interactions with antigen presenting cells in culture and in intact lymphoid tissue. *Immunol Rev.* November 2002;189:51–63.
49. Walz CR, Zedler S, Schneider CP, Albertsmeier M, Loehe F, Bruns CJ, u. a. The potential role of T-cells and their interaction with antigen-presenting cells in mediating immunosuppression following trauma-hemorrhage. *Innate Immun.* August 2009;15(4):233–41.
50. Meynaar IA, Droog W, Batstra M, Vreede R, Herbrink P. In Critically Ill Patients, Serum Procalcitonin Is More Useful in Differentiating between Sepsis and SIRS than CRP, IL-6, or LBP. *Crit Care Res Pract* [Internet]. 2011 [zitiert 17. Januar 2014];2011. Verfügbar unter: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3113363/>
51. Pierrakos C, Vincent J-L. Sepsis biomarkers: a review. *Crit Care.* 2010;14(1):R15.
52. Ulmer AJ, Scholz W, Ernst M, Brandt E, Flad HD. Isolation and subfractionation of human peripheral blood mononuclear cells (PBMC) by density gradient centrifugation on Percoll. *Immunobiology.* Mai 1984;166(3):238–50.
53. Miltenyi S, Müller W, Weichel W, Radbruch A. High gradient magnetic cell separation with MACS. *Cytometry.* 1990;11(2):231–8.
54. Jacobs N, Moutschen MP, Boniver J, Greimers R, Schaaf-Lafontaine N. Efficient immunoselection of cytolytic effectors with a magnetic cell sorter. *Res Immunol.* Februar 1993;144(2):141–50.
55. Johnson RL. Flow cytometry. From research to clinical laboratory applications. *Clin Lab Med.* Dezember 1993;13(4):831–52.
56. Elshal MF, McCoy JP. Multiplex bead array assays: Performance evaluation and comparison of sensitivity to ELISA. *Methods.* April 2006;38(4):317–23.
57. Xu YX, Ayala A, Chaudry IH. Prolonged immunodepression after trauma and hemorrhagic shock. *J Trauma.* Februar 1998;44(2):335–41.
58. Hensler T, Hecker H, Heeg K, Heidecke CD, Bartels H, Barthlen W, u. a. Distinct mechanisms of immunosuppression as a consequence of major surgery. *Infect Immun.* 6. Januar 1997;65(6):2283–91.
59. Faist E, Mewes A, Strasser T, Walz A, Alkan S, Baker C, u. a. Alteration of monocyte function following major injury. *Arch Surg Chic Ill* 1960. März 1988;123(3):287–92.
60. O'Mahony JB, Palder SB, Wood JJ, McIrvine A, Rodrick ML, Demling RH, u. a. Depression of cellular immunity after multiple trauma in the absence of sepsis. *J Trauma.* Oktober 1984;24(10):869–75.



61. Zellweger R, Ayala A, DeMaso CM, Chaudry IH. Trauma-hemorrhage causes prolonged depression in cellular immunity. *Shock Augusta Ga.* August 1995;4(2):149–53.
62. Walz CR, Zedler S, Schneider CP, Mayr S, Loehe F, Bruns CJ, u. a. Depressed T cell-derived IFN-gamma following trauma-hemorrhage: a potential mechanism for diminished APC responses. *Langenbecks Arch Surg Dtsch Ges Für Chir.* Mai 2007;392(3):339–43.
63. Ni Choileain N, Redmond H. Cell response to surgery. *Arch Surg.* 1. November 2006;141(11):1132–40.
64. Deitch EA. Animal models of sepsis and shock: a review and lessons learned. *Shock Augusta Ga.* Januar 1998;9(1):1–11.
65. Mayr S, Walz CR, Angele P, Hernandez-Richter T, Chaudry IH, Loehe F, u. a. Castration prevents suppression of MHC class II (Ia) expression on macrophages after trauma-hemorrhage. *J Appl Physiol Bethesda Md* 1985. August 2006;101(2):448–53.
66. Eisenmenger SJ, Wichmann MW, Angele P, Faist E, Hatz R, Chaudry IH, u. a. Differences in the expression of LPS-receptors are not responsible for the sex-specific immune response after trauma and hemorrhagic shock. *Cell Immunol.* Juli 2004;230(1):17–22.
67. Angele MK, Pratschke S, Chaudry IH. Does gender influence outcomes in critically ill patients? *Crit Care.* 2012;16(3):129.
68. Angele MK, Frantz MC, Chaudry IH. Gender and sex hormones influence the response to trauma and sepsis: potential therapeutic approaches. *Clin São Paulo Braz.* Oktober 2006;61(5):479–88.
69. Kahlke V, Angele MK, Ayala A, Schwacha MG, Cioffi WG, Bland KI, u. a. Immune dysfunction following trauma-haemorrhage: influence of gender and age. *Cytokine.* Januar 2000;12(1):69–77.
70. Angele MK, Knöferl MW, Schwacha MG, Ayala A, Cioffi WG, Bland KI, u. a. Sex steroids regulate pro- and anti-inflammatory cytokine release by macrophages after trauma-hemorrhage. *Am J Physiol.* Juli 1999;277(1 Pt 1):C35–42.
71. Frantz MC, Prix NJ, Wichmann MW, van den Engel NK, Hernandez-Richter T, Faist E, u. a. Dehydroepiandrosterone restores depressed peripheral blood mononuclear cell function following major abdominal surgery via the estrogen receptors. *Crit Care Med.* August 2005;33(8):1779–86.
72. Angele MK, Knöferl MW, Ayala A, Bland KI, Chaudry IH. Testosterone and estrogen differently effect Th1 and Th2 cytokine release following trauma-haemorrhage. *Cytokine.* 7. Oktober 2001;16(1):22–30.
73. Villadangos JA. Presentation of antigens by MHC class II molecules: getting the most out of them. *Mol Immunol.* September 2001;38(5):329–46.
74. Fenton MJ, Golenbock DT. LPS-binding proteins and receptors. *J Leukoc Biol.* Juli 1998;64(1):25–32.

75. Riddell SR, Greenberg PD. The use of anti-CD3 and anti-CD28 monoclonal antibodies to clone and expand human antigen-specific T cells. *J Immunol Methods*. 17. April 1990;128(2):189–201.
76. Liu K, Li Y, Prabhu V, Young L, Becker KG, Munson PJ, u. a. Augmentation in expression of activation-induced genes differentiates memory from naive CD4+ T cells and is a molecular mechanism for enhanced cellular response of memory CD4+ T cells. *J Immunol Baltim Md 1950*. 15. Juni 2001;166(12):7335–44.
77. Harding FA, McArthur JG, Gross JA, Raulet DH, Allison JP. CD28-mediated signalling co-stimulates murine T cells and prevents induction of anergy in T-cell clones. *Nature*. 16. April 1992;356(6370):607–9.
78. Menger MD, Vollmar B. Surgical trauma: hyperinflammation versus immunosuppression? *Langenbecks Arch Surg Dtsch Ges Für Chir*. November 2004;389(6):475–84.
79. Schmand JF, Ayala A, Chaudry IH. Effects of trauma, duration of hypotension, and resuscitation regimen on cellular immunity after hemorrhagic shock. *Crit Care Med*. Juli 1994;22(7):1076–83.
80. Shelley O, Murphy T, Paterson H, Mannick JA, Lederer JA. Interaction between the innate and adaptive immune systems is required to survive sepsis and control inflammation after injury. *Shock Augusta Ga*. August 2003;20(2):123–9.
81. Kramer F, Torzewski J, Kamenz J, Veit K, Hombach V, Dedio J, u. a. Interleukin-1beta stimulates acute phase response and C-reactive protein synthesis by inducing an NFkappaB- and C/EBPbeta-dependent autocrine interleukin-6 loop. *Mol Immunol*. Mai 2008;45(9):2678–89.
82. Rentenaar RJ, De Metz J, Bunders M, Wertheim-Van Dillen PME, Gouma DJ, Romijn JA, u. a. Interferon-gamma administration after abdominal surgery rescues antigen-specific helper T cell immune reactivity. *Clin Exp Immunol*. September 2001;125(3):401–8.
83. Chaudry IH, Ayala A, Ertel W, Stephan RN. Hemorrhage and resuscitation: immunological aspects. *Am J Physiol*. Oktober 1990;259(4 Pt 2):R663–78.
84. De Saint-Vis B, Fugier-Vivier I, Massacrier C, Gaillard C, Vanbervliet B, Aït-Yahia S, u. a. The cytokine profile expressed by human dendritic cells is dependent on cell subtype and mode of activation. *J Immunol Baltim Md 1950*. 15. Februar 1998;160(4):1666–76.
85. Kelner GS, Zlotnik A. Cytokine production profile of early thymocytes and the characterization of a new class of chemokine. *J Leukoc Biol*. Mai 1995;57(5):778–81.
86. Nagorsen D, Marincola FM, Panelli MC. Cytokine and chemokine expression profiles of maturing dendritic cells using multiprotein platform arrays. *Cytokine*. 7. Januar 2004;25(1):31–5.
87. Sussman JJ, Bonifacio JS, Lippincott-Schwartz J, Weissman AM, Saito T, Klausner RD, u. a. Failure to synthesize the T cell CD3-zeta chain: structure and function of a partial T cell receptor complex. *Cell*. 15. Januar 1988;52(1):85–95.

88. Buferne M, Luton F, Letourneur F, Hoeveler A, Couez D, Barad M, u. a. Role of CD3 delta in surface expression of the TCR/CD3 complex and in activation for killing analyzed with a CD3 delta-negative cytotoxic T lymphocyte variant. *J Immunol Baltim Md 1950*. 1. Februar 1992;148(3):657–64.
89. Thomas RM, Gao L, Wells AD. Signals from CD28 induce stable epigenetic modification of the IL-2 promoter. *J Immunol Baltim Md 1950*. 15. April 2005;174(8):4639–46.
90. Antal-Szalmás P, Poppelier MJG, Sümegi A, van der Bruggen T, Verhoef J, van Kessel KPM, u. a. Spare CD14 molecules on human monocytes enhance the sensitivity for low LPS concentrations. *Immunol Lett*. 30. April 2004;93(1):11–5.
91. Rubin B, Geisler C, Kuhlmann J, Plesner T. Fractionation of T cell subsets on Ig anti-Ig columns: isolation of helper T cells from nonresponder mice, demonstration of antigen-specific T suppressor cells, and selection of CD-3 negative variants of Jurkat T cells. *Cell Immunol*. 1. April 1989;119(2):327–40.
92. Ucur E, Mattern J, Wenger T, Okouoyo S, Schroth A, Debatin K-M, u. a. Induction of apoptosis in experimental human B cell lymphomas by conditional TRAIL-expressing T cells. *Br J Cancer*. 1. Dezember 2003;89(11):2155–62.
93. Luongo D, Russo R, Balestrieri A, Marzocco S, Bergamo P, Severino L. In vitro study of AFB1 and AFM1 effects on human lymphoblastoid Jurkat T-cell model. *J Immunotoxicol*. 22. Oktober 2013;
94. Sanlorenzo L, Zhao B, Spight D, Denenberg AG, Page K, Wong HR, u. a. Heat shock inhibition of lipopolysaccharide-mediated tumor necrosis factor expression is associated with nuclear induction of MKP-1 and inhibition of mitogen-activated protein kinase activation. *Crit Care Med*. November 2004;32(11):2284–92.
95. Chávez-Galán L, Sada-Ovalle I, Baez-Saldaña R, Chávez R, Lascurain R. Monocytes from tuberculosis patients that exhibit cleaved caspase 9 and denaturalized cytochrome c are more susceptible to death mediated by Toll-like receptor 2. *Immunology*. April 2012;135(4):299–311.
96. Turtinen LW, Prall DN, Bremer LA, Nauss RE, Hartsel SC. Antibody Array-Generated Profiles of Cytokine Release from THP-1 Leukemic Monocytes Exposed to Different Amphotericin B Formulations. *Antimicrob Agents Chemother*. 2. Januar 2004;48(2):396–403.
97. Palacio JR, Markert UR, Martínez P. Anti-inflammatory properties of N-acetylcysteine on lipopolysaccharide-activated macrophages. *Inflamm Res Off J Eur Histamine Res Soc Al*. Juli 2011;60(7):695–704.
98. Hu C-M, Jang SY, Fanzo JC, Pernis AB. Modulation of T Cell Cytokine Production by Interferon Regulatory Factor-4. *J Biol Chem*. 20. Dezember 2002;277(51):49238–46.
99. Drexler HG, Dirks WG, MacLeod RA. False human hematopoietic cell lines: cross-contaminations and misinterpretations. *Leukemia*. Oktober 1999;13(10):1601–7.
100. Drexler HG, Dirks WG, Matsuo Y, MacLeod RAF. False leukemia-lymphoma cell lines: an update on over 500 cell lines. *Leukemia*. Februar 2003;17(2):416–26.

101. Wenger SL, Senft JR, Sargent LM, Bamezai R, Bairwa N, Grant SG. Comparison of established cell lines at different passages by karyotype and comparative genomic hybridization. *Biosci Rep*. Dezember 2004;24(6):631–9.
102. Hughes P, Marshall D, Reid Y, Parkes H, Gelber C. The costs of using unauthenticated, over-passaged cell lines: how much more data do we need? *BioTechniques*. November 2007;43(5):575, 577–8, 581–2 passim.
103. Lo Y-C, Edidin MA, Powell JD. Selective activation of antigen-experienced T cells by anti-CD3 constrained on nanoparticles. *J Immunol Baltim Md 1950*. 15. November 2013;191(10):5107–14.
104. Albertsmeier M, Quaiser D, von Dossow-Hanfstringl V, Winter H, Faist E, Angele MK. Major surgical trauma differentially affects T-cells and APC. *Innate Immun*. 7. Januar 2014;
105. Wakefield CH, Carey PD, Foulds S, Monson JR, Guillou PJ. Changes in major histocompatibility complex class II expression in monocytes and T cells of patients developing infection after surgery. *Br J Surg*. Februar 1993;80(2):205–9.
106. Nolan A, Weiden M, Kelly A, Hoshino Y, Hoshino S, Mehta N, u. a. CD40 and CD80/86 act synergistically to regulate inflammation and mortality in polymicrobial sepsis. *Am J Respir Crit Care Med*. 1. Februar 2008;177(3):301–8.
107. Marik PE, Flemmer M. The immune response to surgery and trauma: Implications for treatment. *J Trauma Acute Care Surg*. Oktober 2012;73(4):801–8.
108. Wing K, Suri-Payer E, Rudin A. CD4+CD25+-regulatory T cells from mouse to man. *Scand J Immunol*. Juli 2005;62(1):1–15.
109. MacConmara MP, Maung AA, Fujimi S, McKenna AM, Delisle A, Lapchak PH, u. a. Increased CD4+ CD25+ T regulatory cell activity in trauma patients depresses protective Th1 immunity. *Ann Surg*. Oktober 2006;244(4):514–23.
110. Venet F, Foray A-P, Villars-Méchin A, Malcus C, Poitevin-Later F, Lepape A, u. a. IL-7 restores lymphocyte functions in septic patients. *J Immunol Baltim Md 1950*. 15. November 2012;189(10):5073–81.
111. Kong YY, Fuchsberger M, Xiang SD, Apostolopoulos V, Plebanski M. Myeloid derived suppressor cells and their role in diseases. *Curr Med Chem*. 2013;20(11):1437–44.
112. Serafini P. Myeloid derived suppressor cells in physiological and pathological conditions: the good, the bad, and the ugly. *Immunol Res*. Dezember 2013;57(1-3):172–84.
113. Rodriguez PC, Zea AH, Culotta KS, Zabaleta J, Ochoa JB, Ochoa AC. Regulation of T cell receptor CD3zeta chain expression by L-arginine. *J Biol Chem*. 14. Juni 2002;277(24):21123–9.
114. Cuenca AG, Delano MJ, Kelly-Scumpia KM, Moreno C, Scumpia PO, Laface DM, u. a. A paradoxical role for myeloid-derived suppressor cells in sepsis and trauma. *Mol Med Camb Mass*. April 2011;17(3-4):281–92.

115. Menges P, Kessler W, Kloecker C, Feuerherd M, Gaubert S, Diedrich S, u. a. Surgical trauma and postoperative immune dysfunction. *Eur Surg Res Eur Chir Forsch Rech Chir Eur.* 2012;48(4):180–6.
116. Wutzler S, Lustenberger T, Relja B, Lehnert M, Marzi I. [Pathophysiology of multiple trauma : intensive care medicine and timing of treatment]. *Chir Z Für Alle Geb Oper Medizen.* September 2013;84(9):753–8.
117. Lasanianos NG, Kanakaris NK, Dimitriou R, Pape HC, Giannoudis PV. Second hit phenomenon: existing evidence of clinical implications. *Injury.* Juli 2011;42(7):617–29.

## 8 DANKSAGUNG

Zunächst möchte ich mich bei meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. Martin K. Angele bedanken, der mir dieses Thema zur Fertigstellung meiner Dissertation überlassen hat. In vielen guten Jahren der gemeinschaftlichen Zusammenarbeit hat er mir die verschiedensten wissenschaftlichen Arbeitsweisen vermittelt und mir stets als guter Berater in den verschiedensten Situationen zur Seite gestanden. Dabei hat sich stellenweise ein freundschaftliches Verhältnis entwickelt, das mir während meiner ganzen bisherigen medizinischen Laufbahn, ausgesprochen wertvoll war.

Außerdem bedanke ich mich bei meinem Betreuer Herrn Dr. Markus Albertsmeier, der immer ein offenes Ohr für meine Belange hatte und mir mit viel Geduld beigebracht hat wie man Daten ordentlich statistisch auswertet.

Frau Dr. Natasja van den Engel gilt mein Dank für ihre ständige Bereitschaft Arbeitsabläufe im Labor korrekt durchzuführen. Insbesondere die flowzytometrischen Messungen wären in dieser Form ohne sie nicht möglich gewesen.

Danke auch an Dominik Quaiser, der mich, als mein direkter Vorgänger in der Arbeitsgruppe, hervorragend in alle möglichen Feinheiten eingewiesen hat, die es bei der experimentellen Arbeit im Labor zu beachten gab.

Meinen Eltern möchte ich ebenfalls danke sagen dafür, dass sie mich immer wieder aufgefordert haben die Arbeit an meiner Dissertation zielstrebig zu Ende zu bringen.

Und zu guter Letzt, aber sicherlich für mich persönlich am wichtigsten möchte ich mich bei meiner Frau Catharina bedanken, die mir immer wieder den Rücken gestärkt und freigehalten hat, damit ich die nötige Zeit fand um im Labor zu stehen oder am Schreibtisch zu sitzen. Ihre Geduld und ihr Verständnis haben mich immer wieder aufgebaut und vorangebracht.

Daneben gab es noch einige andere Leute, die mir die Zeit im Labor versüßt haben, mit mir wissenschaftliche Fragen diskutiert haben, mir Methoden beigebracht haben oder einen passenden Kommentar zu meiner Arbeit bereit hatten. Ohne sie alle namentlich zu nennen, möchte ich mich auch ganz herzlich bei diesen vielen Personen bedanken.

## 9 EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG

Ich, Niclas Jasper Prix, erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

Mechanismen der kompromittierten Interaktion von  
T-Zellen und antigenpräsentierenden Zellen bei  
abdominalchirurgischen und septischen Patienten.

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

---

Ort, Datum

---

Unterschrift Doktorandin/Doktorand